Untersuchungen zur Hydrolyse von Albomycin durch Escherichia coli K-12 Aktivierung des Antibiotikums durch Abspaltung des Transportteils

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
KLAUS GÜNTHNER
aus Friedrichshafen

1983

83 332

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0050

Untersuchungen zur Hydrolyse von Albomycin durch Escherichia coli K-12 Aktivierung des Antibiotikums durch Abspaltung des Transportteils

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
KLAUS GÜNTHNER
aus Friedrichshafen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 30. August 1983
Dekan: Professor Dr. K. P. Hadeler
1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. K. Hantke

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. Braun und Herrn Dr. habil. K. Hantke
am Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie II
der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. V. Braun für die
Überlassung des Themas und für die gute Betreuung der
Arbeit. Dieser Dank gilt auch für Herrn Dr. habil. K. Hantke.

Mein weiterer Dank gilt
Herrn Dr. H.-P. Fiedler für die großzügige Bereitstellung
von Albomycin, für die Hilfe bei der Durchführung der
Hochdruckflüssigkeitschromatographien und für viele
wertvolle Anregungen,
Herrn Dr. K. Heller für unermüdliche Diskussion und
praktische Unterstützung,
Herrn Dr. E. Fischer für ständige Diskussion und Hilfsbe-
reitschaft,
Herrn Dr. habil. H. Wolf für wertvolle Unterstützung
und Anregungen,
Frau H. Wolff für die Anfertigung der Photografien,
Herrn K. Wusch für die Anfertigung der Zeichnungen
allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II
für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Material	7
2.2.	Nährmedien	8
2.3.	Puffer	9
2.4.	Verwendete Bakterienstämme	10
2.5.	Konzentrationsbestimmung von Albomycin mittels des Plattendiffusionstests	10
2.6.	Bestimmung der Überlebensrate	11
2.7.	Proteinbestimmung mit Fluram	11
2.8.	Präparation des Rohextrakts	12
2.9.	Gelelektrophorese	12
2.10.	Säulenchromatographische Verfahren	13
2.11.	Dünnschichtchromatographie	14
2.12.	Adsorption an XAD-2	14
2.13.	Präparation von Desferrialbomycin	15
2.14.	Inaktivierung von Albomycin durch ganze Zellen	15
2.15.	Inaktivierung von Albomycin durch Enzympräparationen	16
2.16.	Beladung der tRNA	16
3.	Ergebnisse	18
3.1.	Einfluß des Kulturmediums auf die Inaktivierung von Albomycin durch ganze Zellen	18

Seite

3.2. Bestimmung der Überlebensrate bei AB2847 und H1085 in Abhängigkeit vom Medium 20

3.3. Inaktivierung von Albomycin durch Rohextrakte 22

3.4. Charakterisierung der Albomycin-spaltenden Aktivität 25

3.4.1. Einfluß von Kationen 26

3.4.2. Einfluß von NADH und Dipyridyl auf die Inaktivierung von Albomycin 27

3.4.3. pH-Abhängigkeit der Inaktivierung von Albomycin 29

3.4.4. Hemmstoffe 30

3.5. Chromatographische Verfahren zur Reinigung der Albomycin-spaltenden Aktivität 31

3.5.1. Gelfiltration mit Sephacryl S-200 Superfine 31

3.5.2. Reinigung an DEAE-Sepharose 33

3.5.3. Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose 35

3.5.4. Affinitätschromatographie an Thiopropyl-sepharose und Blue Sepharose 40

3.5.5. Vergleich der Stämme AB2847, H416 und H416 Ar2/2 42

3.6. Spaltprodukte von Albomycin 44

3.6.1. Trennung von Spaltprodukten auf Bio-Gel P2 44

		Seite
3.6.2.	Trennung von Spaltprodukten auf LKB GF05	48
3.7.	Charakterisierung der Spaltprodukte	50
3.7.1.	Biologische Aktivität der Spaltprodukte	52
3.7.2.	Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte	52
3.8.	Einfluß der Spaltprodukte auf die Beladung *in vitro*	54
4.	Diskussion	56
4.1.	Versuche mit ganzen Zellen	56
4.2.	*In vitro* Versuche zur Spaltung von Albomycin	58
4.3.	Albomycin spaltende Aktivitäten	60
4.4.	Spaltung von Desferrialbomycin	63
4.5.	Beladung von tRNA	65
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literaturverzeichnis	68

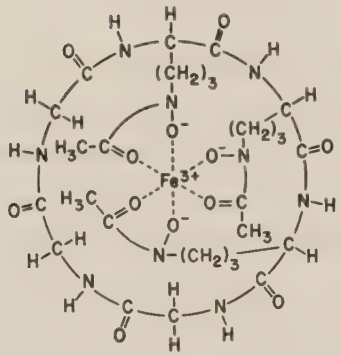
Abkürzungen

DTE	1,4-Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
E_x	Extinktion bei x nm
KPP	Kaliumphosphatpuffer
NB	Nutrient Broth
NEM	N-Äthylmaleinimid
OD_{578}	Optische Dichte bei 578 nm
PCMPS	p-Chloromercuriphenylsulfonat
PHMB	p-Hydroxymercuribenzoat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyläthylendiamin
TLCK	Nα-p-Tosyl-L-Lysin Chloromethylketon
TPCK	L-1-Tosylamid-2-phenyläthyl Chloromethylketon
TRAP	Triäthanolaminpuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TY	Tryptone Yeast
UpM	Umdrehungen pro Minute

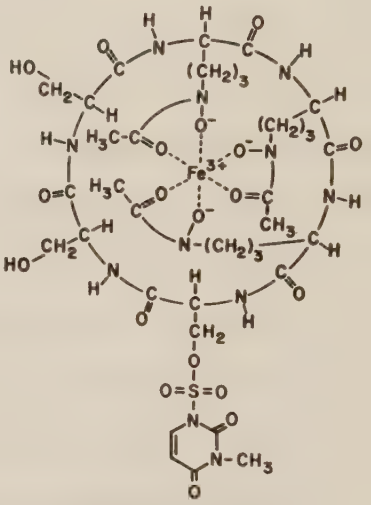
1. Einleitung

Aus Kulturfiltraten von Streptomyces griseus läßt sich ein zur Gruppe der Sideromycine gehörender Antibiotikakomplex isolieren. Je nach Aufarbeitung werden bis zu fünf verschiedene Komponenten gefunden. Bei einer neuen schonenden Aufarbeitung werden nur zwei biologisch aktive Komponenten erhalten, wobei im gereinigten Produkt die jeweils andere Komponente in geringer Menge vorliegt (13). Es handelt sich um Albomycin δ_2, welches nach Maehr und Pitcher (30) die ursprüngliche Komponente ist, und um Albomycin δ_1. UV- und NMR-Spektren sind identisch mit den von Maehr und Berger (29) isolierten Antibiotika Ro 5-2667, Ro 7-7730 und Ro 7-7731. Sie entsprechen Albomycin δ_2, Albomycin δ_1 und Albomycin ε. Bei den beiden letztgenannten Albomycinen handelt es sich um Abbauprodukte des ursprünglichen Albomycins δ_2, die jedoch biologisch aktiv sind. Die Chemie der Albomycine wurde ursprünglich in den Laboratorien von Sorm (46, 47) und Poddubnaya (41) untersucht. Danach ähnelt die Struktur der Albomycine im Peptidteil stark der Struktur der Sideramine vom Ferrichromtyp: Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferricrocin. Diese Ähnlichkeit in der Struktur erklärt auch die Ähnlichkeit im Verhalten. Allgemeine Merkmale der Sideromycine sind die Aufhebung der Wirkung durch Sideramine (2) sowie das Auftreten zahlreicher resistenter Keime (1). Anfangs wurde der Sideromycin-Sideramin-Antagonismus in ursächlichem Zusammenhang mit der Wirkungsweise der Sideromycine gesehen (52), jedoch

konnten Burnham (7) und später Nüesch und Knüsel (38) zeigen, daß keine direkte Beziehung zwischen der Funktion der Sideramine und der Wirkungsweise der Sideromycine besteht.



Ferrichrom .



Albomycin.

Abb.1 Struktur von Ferrichrom im Vergleich mit der alten Struktur von Albomycin. Siehe jedoch Abb.2

Die Kreuzresistenz von Albomycin und Ferrichrom beruht auf der Benutzung des gleichen Transportsystems (14). Zellen, die Ferrichrom nicht benutzen können, sind auch gegen Albomycin resistent. Die Aufnahme von Ferrichrom und Albomycin ist in der Literatur ausführlich dargestellt (4, 5, 14, 16, 18, 19, 27, 28).

Da mehrere Funktionen für den Transport von Albomycin nötig sind, von denen keine für die Zelle essentiell ist, tritt leicht spontane Resistenz auf. So weisen auch die meisten Albomycin-resistenten Mutanten einen Defekt in diesen Funktionen auf. Daneben treten einige resistente Mutanten mit intaktem Transportsystem auf, welche gegen die Phagen T5 und Ø80 sowie gegen Colicin M sensitiv sind und Ferrichrom verwerten können. Die Resistenz der Mutanten dieses Typs ist ungeklärt (4).

Unter Ausnutzung des den Sideraminen und Sideromycinen gemeinsamen Transportsystems koppelte Zähner et al. (53) Sulfonamide an Ferricrocin. Die Antagonisierung durch Sideramine zeigte, daß diese semisynthetischen Sideromycine den natürlichen Sideromycinen in der Aufnahme glichen. Die Antagonisierung durch p-Aminobenzoesäure, einem Antagonisten der Sulfonamide, legte eine Spaltung in Transport- und Wirkteil nahe. Gegen Escherichia coli waren die Produkte jedoch wirkungslos.

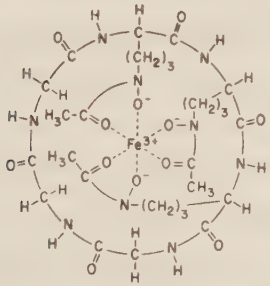
Auch die Struktur von Albomycin zeigt zwei Komponenten in einem Molekül. Danach könnte der Pyrimidinteil, analog zum Sulfonamid, vom Sideraminteil, der als Vehikel benutzt wird, abgespalten werden und so erst seine Wirkung zeigen. Einen ersten Nachweis von Hydrolyseprodukten erbrachte Hartmann (18). Dabei trat die Tritiummarkierung, welche durch Ersatz der N-Acetyl-Gruppen im Sideraminteil durch Tritium-markierte Acetyl-Gruppen erhalten worden war, nach Gelfiltration auf Bio-Gel P2 an der Position von Trilysin auf, während die zum vermutlichen Wirkteil gehörende

Schwefelmarkierung in der Zelle blieb. In vitro wurden die gleichen Produkte wie in vivo erhalten.

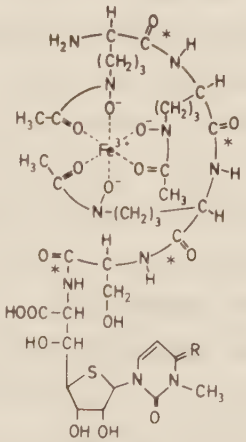
Die Hydrolyse von Siderophoren wird schon länger diskutiert, da die Erklärung der Eisen-Mobilisierung wegen der hohen Affinitätskonstanten von 10^{30} gewisse Schwierigkeiten bereitet. O'Brien (39) schlug eine Hydrolyse von Enterochelin durch eine Esterase mit dadurch erfogender Freisetzung des Eisens vor. Nach Bryce (6) zeigte das gleiche Enzym jedoch nur gegen die eisenfreie Form Aktivität. Emery (12) fand für eine Ornithinesterase aus Fusarium roseum ebenfalls nur Aktivität gegen die eisenfreie Form von Fusarinin C, während eine Esterase aus einer Penicillium spec. auch gegen die Eisen enthaltende Form aktiv war. Das gleiche Enzym erwies sich jedoch als inaktiv, wenn Fe^{3+} durch Al^{3+}, welches nicht reduziert werden kann, ersetzt wurde. Es erscheint wahrscheinlich, daß die angeführten Siderophore vor der Spaltung durch Reduktion des Eisens und dessen Überführung in Protoporphyrin (42) in die eisenfreie Form überführt werden müssen.

Während Warren (50) von einer Pseudomonas spec. mit der Fähigkeit zum Wachstum auf Ferrichrom als einziger C- und N-Quelle berichtete, konnte Emery (11) bei dem Ferrichrom-produzenten Ustilago sphaerogena keine hydrolytische Aktivität gegen Ferrichrom finden. Warren fand einen Abbau von mehreren cyclischen Peptidantibiotika, jedoch nicht von Albomycin. Hartmann (20) fand eine wahrscheinlich durch Acetylierung erfolgende Modifikation von Ferrichrom, wobei die modifizierte Form eine wesentlich geringere Affinität

zu Fe^{3+} hat und bald im Medium auftritt. Bei allen Vorschlägen wurde der Siderophor nach Reduktion des Fe^{3+} zu Fe^{2+} modifiziert und so dem System entzogen. Albomycin, selbst ein effektiver Ionophor, wird offensichtlich nicht wie das vermeintlich strukturanaloge Ferrichrom modifiziert, sondern unterliegt einer Hydrolyse.



Ferrichrom .



Albomycin δ_1 R = O

Albomycin δ_2 R = N–C(=O)–NH_2

Albomycin ε R = NH

Abb.2 Vergleich von Ferrichrom und der neuen Struktur von Albomycin nach Benz et al. (3). Die Sternchen zeigen vermutliche Spaltstellen durch Peptidasen an.

Eine nach Abschluß der vorliegenden Arbeit veröffentlichte Struktur von Albomycin (Abb.2) bietet Ansätze für eine Spaltung durch Peptidasen, welche beim Ferrichromtyp nicht

gegeben waren.

In einer Übersicht von Miller (33) werden Peptidasen und Proteasen von Escherichia coli und Salmonella typhimurium mit zum Teil überlappenden Spezifitäten aufgeführt. Eine oder mehrere dieser Peptidasen könnten an der Spaltung von Albomycin beteiligt sein. Der Wirkort von Albomycin oder dessen Spaltprodukt (en) ist noch nicht bekannt. Die Beladung verschiedener tRNA-Species wurde durch intaktes Albomycin gehemmt, wenn die zur Beladung eingesetzte Fraktion wenig gereinigt war (8), die zellfreie Proteinsynthese wurde durch intaktes Albomycin nicht gehemmt (9). An gleicher Stelle wird jedoch die Abnahme der Hemmwirkung eines anderen Sideromycins (A 22765) mit zunehmender Reinigung entsprechender Zellfraktionen gezeigt. Dieser Befund legt ebenfalls die Bedingung einer vorhergehenden Spaltung und damit Aktivierung des Sideromycins nahe.

Bisherige Ergebnisse lassen vermuten, daß Albomycin zur Entfaltung seiner Hemmwirkung gespalten werden muß, und somit die vermeintliche Inaktivierung, welche mit einer "Entgiftungsreaktion" verglichen werden könnte, in Wirklichkeit die Aktivierung des Wirkteils darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Versuch unternommen, mit Enzympräparationen aus Escherichia coli Spaltprodukte zu erhalten und deren Wirkung zu untersuchen. Im Verlauf der Arbeit wird zuweilen nicht von Aktivierung gesprochen, sondern von Inaktivierung, da die enzymatischen Spaltprodukte nicht mehr auf ganze Zellen des Testkeims wirken und die verringerte biologische Aktivität von Albomycin ein Maß für den Abbau darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma E. Merck, Darmstadt.

Albumin aus Rinderserum	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
ATP	Boehringer GmbH, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA
Bacto-Trypton	Difco, s. o.
Blue Sepharose 6B	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Coomassie Brilliant Blau G250	Serva, s. o.
DEAE-Sepharose 6B	Pharmacia, s. o.
Fluram	Hoffman-La Roche AG, Basel, Schweiz
NADH	Boehringer, s. o.
Nutrient Broth	Difco, s. o.
Phenylsepharose 6B	Pharmacia, s. o.
Protaminsulfat	Boehringer, s. o.
Proteinase K	Boehringer, s. o.
Servachrom XAD-2 100 - 200 u	Serva, s. o.
Thiopropylsepharose 6B	Pharmacia, s. o.
Yeast Extract	Difco, s. o.

Radiochemikalien stammen von Amersham Buchler GmbH, Braunschweig.

Albomycin wurde freundlicherweise von Dr. H.-P. Fiedler, Lehrstuhl für Mikrobiologie I, zur Verfügung gestellt.

2.2. Nährmedien

TY-Medium:	Bacto Trypton	8 g
	Yeast Extract	5 g
	NaCl	5 g

Mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

NB-Medium	Nutrient Broth	8 g
	NaCl	5 g

Mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

M9-Salze:	$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	7,5 g
	KH_2PO_4	3,0 g
	NaCl	0,5 g
	NH_4Cl	1,0 g

Mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

DM-Salze:	KH_2PO_4	3,0 g
	K_2HPO_4	7,0 g
	Na_3-Citrat $\times 2\ H_2O$	0,5 g
	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	0,1 g
	$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g

Mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurde 15 g Agar pro 1 l Medium zugegeben.

Zusammensetzung des Minimalmediums für AB2847:

M9-Salze	100 ml
Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalanin-lösung (je 1 mg/ml)	10 ml
p-Aminobenzoesäure-, p-Hydroxybenzoesäure-lösung (2 mM)	2 ml
Glucoselösung (40%)	1 ml
Na-Citratlösung (1 M)	1 ml
Thiaminlösung (1 mg/ml)	1 ml
$MgSO_4$-Lösung (1 M)	0,1 ml
$CaCl_2$-Lösung (0,1 M)	0,1 ml

2.3. Puffer

SP-10	60 mM Tris/HCl pH 7,6
	30 mM NH_4Cl
	30 mM KCl
	10 mM $MgCl_2$
	1 mM DTE
TRAP	50 mM Triäthanolamin/HCl pH 7,5

2.4. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp und Eigenschaften	Herkunft oder Referenz
E. coli K-12		
AB2847	F^-, *aroB thi tsx malT*	Mikro II
H416	*leu pro aro recA hsdR hsdM*	Mikro II
H416 Ar2/2	wie H416 aber: *pepN*	12 a
H1085	wie AB2847 aber: *pepN*: :Mu *cts*	5 a
Zi33	wie AB2847 aber: Δ (*pro lac*) pepN: :Mu *d1* (Ap *lac*)	5 a, 55

Mikro II: Lehrstuhl für Mikrobiologie II, Stammsammlung

E. coli K-12 W3110 wurde als Testkeim zur Konzentrationsbestimmung von Albomycin benutzt (13).
E. coli K-12 D22 (37) wurde als Testkeim für Spaltprodukte von Albomycin benutzt, da dieser Stamm für verschiedene Substanzen besonders "durchlässig" ist (36).

2.5. Konzentrationsbestimmung von Albomycin mittels des Plattendiffusionstests

Eine Übernachtkultur von *Escherichia coli* K-12 W3110 in TY-Medium wurde zweimal mit Saline gewaschen und mit Saline auf eine OD_{578} von 1,3 eingestellt. 1 ml dieser Suspension, 1 ml TTC (20 mg/ml Äthanol) und 1 ml Glucose (40%) wurden zu 100 ml DM-Agar gegeben. Nach guter Durchmischung wurden

Platten von 10 ml Volumen gegossen. In ausgestanzte Löcher von 6 mm Durchmesser wurden 20 µl der Probe pipettiert. Die Konzentration an Albomycin wurde entsprechend einer erwarteten Hemmzone von 20 bis 30 mm Durchmesser gewählt. Anhand einer linearen Regression der Meßwerte aus dem Bereich 0,1 µg/ml bis 0,8 µg/ml wurde eine Eichkurve erstellt. Im allgemeinen erfolgte eine Korrektur der Konzentration anhand eines auf jeder Platte mitgeführten Eichstandards. Der Durchmesser der Hemmzone zeigt eine lineare Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentration gemäß folgender Gleichung: $d = a + b \times \log c$
Für die Konstanten a und b wurden die Werte 29,4 und 13,9 erhalten.

2.6. Bestimmung der Überlebensrate

Die Kulturen wurden im jeweiligen Medium bis zu einer OD_{578} von 0,5 angezogen und im gleichen, eiskalten Medium geeignet verdünnt, so daß nach dem Ausstreichen auf TY-Platten ca. 100 Kolonien zu zählen waren. Als Bezugsgröße wurde eine gleich behandelte Probe, jedoch ohne Albomycin, mit 100 Prozent angenommen.

2.7. Proteinbestimmung mit Fluram

Die Proteinlösung in 1,5 ml Natriumboratpuffer (0,2 M, pH 9) wurde mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Fluramlösung (3 mg/10 ml Dioxan) schnell gemischt. Die Fluoreszens wurde in einem Eppendorf-Photometer mit Fluoreszens-

aufsatz 1030 bei den Anregungswellenlängen 405 + 436 nm gemessen. Anhand einer jedesmal neu bestimmten Eichkurve mit Rinderserumalbumin (1 - 80 µg) wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.8. Präparation des Rohextrakts

Die abzentrifugierten Zellen wurden in TRAP + 10 mM $MgCl_2$ suspendiert (16 g Naßgewicht/50 ml Puffer) und in der "French Press" bei einem Druck von 20 000 Psi aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde durch eine Zentrifugation (20 Minuten, 10 000 UpM, Sorvall SS34) von Zelltrümmern befreit. Anschließend wurde noch suspendiertes Material durch eine hochtourige Zentrifugation bei 100 000 x g abgetrennt. Der so gewonnene Rohextrakt hatte im allgemeinen eine Proteinkonzentration von 20 mg/ml. Für beabsichtigte weitere Reinigungsschritte wurden Nukleinsäuren generell mit Protaminsulfat (0,08%) gefällt.

2.9. Gelelektrophorese

Es wurden Slab-Gele aus einem Trenn- und Konzentrierungsgel von ca. 12 cm Länge gegossen. Das Trenngel enthielt 11% Acrylamid und 0,2% Methylenbisacrylamid in 0,375 M Tris mit 0,2% SDS, pH 8,8. Die Polimerisation wurde wie auch im Konzentrierungsgel durch Zugabe von 0,02% Ammoniumpersulfat und 0,02% TEMED eingeleitet. Das Konzentrierungsgel enthielt 3% Acrylamid, 0,08% Methylenbisacrylamid und 0,1% SDS in 0,125 M Tris, pH 6,8. Die Proteine wurden

mit eiskaltem Äthanol (50%) gefällt und anschließend in einer Lösung aus 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoäthanol und 0,001% Bromphenolblau in 0,0625 M Tris, pH 6,8, fünf Minuten gekocht und nach Abkühlen in Portionen von 10 - 20 µl in die Geltaschen gefüllt. Pro Tasche wurden zwischen 10 und 20 µg Protein aufgetragen. Die Trennung wurde bei Raumtemperatur mit einem aus 0,192 M Glycin, 0,1% SDS und 0,025 M Tris bestehenden Puffer bei konstanter Stromstärke (15 - 20 mA) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau in 50% Methanol mit 10% Eisessig. Entfärbt wurde unter mehrmaligem Wechsel mit einer Lösung von 5% Methanol und 7,5% Eisessig in Wasser.

2.10. Säulenchromatographische Verfahren

Die Gelmaterialien wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen vorbehandelt. Die Füllung der Säulen erfolgte mittels eines aufgesetzten Reservoirs. Nach Erreichen einer Füllhöhe von ca. 1 cm wurde das Auslaßventil geöffnet und bis zur gewünschten Füllhöhe unter hydrostatischem Druck von maximal 100 cm H_2O gefüllt. Jede Säule wurde vor einer Trennung mit mindestens zwei Säulenvolumina des entsprechenden Elutionsmittels gewaschen. Die korrekte Füllung bei Gelfiltrationsmaterialien wurde anhand des Laufs von Dextranblau kontrolliert, wobei auch das Ausschlußvolumen der Säule ermittelt wurde. Die Trennung

von Proteinen wurde bei 5 °C - 7 °C in Glassäulen mit Außenmantel von Pharmacia durchgeführt. Für Gelfiltration wurden Glassäulen mit 100 cm Länge und 1,6 cm innerem Durchmesser bei einer Füllhöhe von ca. 90 cm benutzt, bei Ionenaustauschchromatographie solche mit 30 - 40 cm Länge. Die Proben, bei Gelfiltration 2 - 5 ml, wurden über einen aufgesetzten Adapter mittels einer Schlauchpumpe aufgetragen. Die Trennung wurde anhand der UV-Absorption und der Leitfähigkeit verfolgt.

2.11. Dünnschichtchromatographie

Es wurden mit Cellulose beschichtete Aluminiumplatten Nr. 5574 der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.
System I: (13) 1-Propanol/0,2 M Ammonsulfat (5/3, v/v)
System II: Äthanol/Eisessig/H_2O (4/1/1, v/v)
Nach einer Laufstrecke von 10 - 12 cm wurden die Platten an der Luft getrocknet. Die Trennung wurde zuerst anhand der Fluoreszenslöschung verfolgt, anschließend wurde mit verschiedenen Färbereagenzien angefärbt.

2.12. Adsorption an XAD-2

Vo einer wässrigen XAD-Suspension wurden nach Absitzen des Materials 200 µl entnommen und mit maximal dem gleichen Volumen der wässrigen Probe kräftig geschüttelt. Nach Absitzen der XAD-Perlen wurde dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit 50% Methanol eluiert.

2.13. Präparation von Desferrialbomycin

20 mg Albomycin wurden in 4,8 ml H_2O gelöst und mit 30 mg 8-Hydroxychinolin, gelöst in 2 ml Methanol, zugedeckt 23 h gerührt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Waschwasser und der Überstand der Zentrifugation wurden vereinigt und 3-mal mit je 5 ml Chloroform im 50 ml Scheidetrichter extrahiert. Die wässrigen, leicht gelben Überstände wurden am Rotationsverdampfer bei 35 ^{o}C vom Chloroform befreit und dann lyophilisiert. Alle benutzten Gefäße waren zuvor gründlich gereinigt, mit EDTA (10 mM) und anschließend Wasser gespült worden.
Ausbeute: 12 mg eines weißlichen Pulvers.

2.14. Inaktivierung von Albomycin durch ganze Zellen

Für die Inaktivierung mit ganzen Zellen wurde eine Albomycinkonzentration zwischen 0,4 µg/ml und 0,8 µg/ml gewählt, da sich der Abbau bei höheren Konzentrationen nicht erkennen ließ. Die Zelldichte sollte mindestens 10^9 Zellen/ml betragen. Im allgemeinen wurde eine Zelldichte von 1,5 x 10^9 Zellen pro ml eingesetzt. Zu Beginn der Inkubation mit Albomycin wurde eine Probe entnommen und nach Abzentrifugieren der Zellen auf Eis gestellt. Die Proben zu den anderen Zeitpunkten wurden ebenso behandelt. Von jeder Probe wurden dann 20 µl auf DM-Platten aufgetragen.

2.15. Inaktivierung von Albomycin durch Enzympräparationen

Wo nicht anders angeführt, wurde die Inaktivierung in Ansätzen von 0,15 ml durchgeführt. Der Ansatz enthielt: TRAP, NADH (10 mM), Dipyridyl (1 mM), $MgCl_2$ (10 mM), Albomycin bzw. Desferrialbomycin (5 µg/ml und mehr). Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden 0,01 ml entnommen und mit Wasser so verdünnt, daß ein Hemmhof von 25 bis 30 mm Durchmesser zu erwarten war. Die Inkubation bei 37 °C dauerte je nach Proteinkonzentration zwischen 20 Minuten und 4 Stunden.

2.16. Beladung der tRNA

Herstellung der Beladungsenzyme: 15 ml eines 100 000 x g Überstands von Escherichia coli K-12 W3110 wurden an 2 ml DEAE-Sepharose 6B adsorbiert und nach Waschen mit Puffer (60 mM Tris/HCl, pH 7,6) mit 0,4 M KCl im gleichen Puffer eluiert. Die getrennt aufgefangenen Fraktionen wurden mit Glycerin (1/1, v/v) gemischt und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Beladung wurden zwei Lösungen hergestellt.

Lösung I:	tRNA (50 mg/ml)	50 µl
	ATP (50 mM)	50 µl
	^{14}C-Aminosäure	50 µl
	SP-10	1 ml

Folgende Aminosäuren wurden eingesetzt:

^{14}C-Ileu	318 mCi/mMol	157 pMol/µl
^{14}C-Leu	351 mCi/mMol	142 pMol/µl
^{14}C-Lys	63 mCi/mMol	793 pMol/µl

Lösung II:	Enzym	10 µl
	SP-10	10 µl
	Inhibitor, bzw. H_2O	10 µl

Die Lösung II wurde nach 5 Minuten Vorinkubation bei Raumtemperatur auf Eis gestellt. Der Start der Beladung erfolgte mit 0,07 ml von Lösung I. Nach 2, 5 und 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden jeweils 0,02 ml entnommen und auf Filter pipettiert (3MM, 2,3 cm Ø, Whatman, W&R. Balston Ltd., England). Die Reaktion wurde durch Tränken der Filter mit eiskalter TCA (5%) gestoppt. Anschließend wurde je einmal mit eiskalter TCA (5%), Äther/Äthanol (1/1, v/v) und Äther gewaschen. Die Radioaktivität wurde nach Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Toluol + 0,5% PPO) zu den trockenen Filtern gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß des Kulturmediums auf die Inaktivierung von Albomycin durch ganze Zellen

Mit Albomycin wird im Plattendiffusionstest auf TY-Platten ein ca. 8 mm kleinerer Durchmesser der Hemmzone erhalten als auf M9-Platten. Da die Platten mindestens 16 Stunden inkubiert werden, ist es vorstellbar, daß die Albomycin-Konzentration im Randbereich der Diffusionszone zur Abtötung der Zellen nicht ausreicht, und somit auf TY-Medium, wo die Zellen schneller wachsen als auf M9-Medium, durch das Wachstum der überlebenden Zellen ein geringerer Durchmesser erreicht wird. Andererseits könnte Albomycin auch an Bestandteile des komplexen Mediums adsorbieren und somit für die Aufnahme in die Zelle nicht mehr zur Verfügung stehen.
Um den Einfluß des Mediums auf das Wachstum und auf eine eventuelle Adsorption von Albomycin zu egalisieren, wurden die Zellen bei Inaktivierungsexperimenten in Flüssigkultur nach Wachstum in beiden Medien zweimal mit M9-Salzen + 1 mM $MgSO_4$ gewaschen. Die Inaktivierung erfolgte nach Resuspension der Zellen im gleichen Puffer mit Zusatz von 0,4% Glucose. Neben der Inaktivierung durch Zellen des Wildtyps AB2847 wurden Zellen des partiell resistenten Stamms H1085 auf die Inaktivierung von Albomycin untersucht. Die Zellen wurden bei einer OD_{578} von 0,6 geerntet und auf eine OD_{578} von 1,8 eingestellt, da die Inaktivierung

bei niedriger Zelldichte nicht beobachtet werden kann.

Tab.1 Inaktivierung von Albomycin durch ganze Zellen von AB2847 und H1085. Inkubationstemperatur 37 °C, Albomycin (0,4 µg/ml)

	Prozent Abbau/10^9 Zellen		
Inkubationszeit (Minuten)	10	30	50
AB2847 (TY)	15	25	29
AB2847 (M9)	32	/	/
H1085 (TY)	-	-	-
H1085 (M9)	20	20	25

/ bedeutet: Albomycin nicht mehr nachweisbar

- bedeutet: kein Abbau

Normalerweise wurden mit dem Stamm AB2847 höhere Abbauraten auch auf TY-Medium erhalten, jedoch wurde mit Zellen aus TY-Medium immer ein geringerer Abbau als mit Zellen aus M9-Medium beobachtet. Die geringere Empfindlichkeit in TY-Medium findet ihre Entsprechung in der geringeren Inaktivierung von Albomycin. Zuweilen zeigten ansonst normal sensitive Zellen von AB2847 nur noch eine geringe Inaktivierung von Albomycin und damit auch eine geringe Empfindlichkeit. Dieses Verhalten dürfte auf eine Schädigung der Zellen durch mehrfaches Waschen zurückzuführen sein.

3.2. Bestimmung der Überlebensrate bei AB2847 und H1085 in Abhängigkeit vom Medium

Der in TY-Medium Albomycin-resistente Stamm H1085 zeigte in M9-Medium eine geringere Empfindlichkeit gegen Albomycin und eine geringere Inaktivierung als der Stamm AB2847. Diese Unterschiede in der Empfindlichkeit und Inaktivierung sollten auch anhand der Überlebensrate festzustellen sein.

Tab.2 Überlebensrate bei AB2847 und H1085 in TY- und M9-Medium. Nach Anzucht der Zellen bis OD_{578} von 0,5 wurde Albomycin (0,4 µg/ml) zugegeben. Zur Plattierung wurden Zellen aus TY-Medium mit TY-Medium (0 °C), Zellen aus M9-Medium mit M9-Salzen (0 °C) verdünnt. Die Zellzahl zum Zeitpunkt der Albomycin-Zugabe wurde als 100 Prozent gesetzt. Die Inkubationszeit mit Albomycin bei 37 °C betrug 30 Minuten.

Stamm	Medium	Prozent Zellen
AB2847	TY	39
AB2847	M9	2
H1085	TY	a
H1085	M9	6

a: Zellwachstum während der Inkubationszeit mit Albomycin

Die Inaktivierung von Albomycin ließ sich bei dieser geringen Zelldichte nicht bestimmen. Mit gewaschenen Zellen,

um Wachstum während des Versuchs zu verhindern, wurde auch mit dem Stamm H1085 ein geringer Abbau von Albomycin erhalten, wobei auch in TY-Medium eine geringere Überlebensrate zu beobachten war.

Tab.3 Überlebensrate bei gewaschenen Zellen von AB2847 und H1085 aus TY- und M9-Medium. Nach Wachstum bis OD_{578} von 0,5 wurden die Zellen zweimal mit kalten M9-Salzen + 1 mM $MgSO_4$ gewaschen und im gleichen Puffer mit Zusatz von Glucose (0,4%) resuspendiert. Bei AB2847 wurde eine Zellzahl von $1,4 \times 10^9$, bei H1085 eine Zellzahl von $1,6 \times 10^9$ eingesetzt. Inkubationszeit mit Albomycin: 45 Minuten bei 37 °C.

Stamm	Medium	Überlebende (Prozent)	Proz. Abbau/ 10^9 Zellen
AB2847	TY	12	/
AB2847	M9	7	/
H1085	TY	34	19
H1085	M9	14	31

/ bedeutet: Albomycin war nicht mehr nachzuweisen, mehr als 90 Prozent Abbau

Der Stamm H1085 zeigte sich zuweilen sehr empfindlich, wenn die Verdünnung mit in TY-Medium angezogenen Zellen vorgenommen wurde. Die hier beobachtete hohe Sterberate von über 60 Prozent könnte zum Teil auch auf die Verdünnung

zurückzuführen sein. Insgesamt ließ sich aus vielen Versuchen nur das qualitative Ergebnis ermitteln, daß der Stamm H1085 Albomycin wesentlich schlechter abbaut als der Stamm AB2847 und auch weit weniger empfindlich gegen Albomycin ist.

3.3. Inaktivierung von Albomycin durch Rohextrakte

Nach Hartmann (18) wies der Stamm H1085 nach Wachstum in Ty-Medium keine Unterschiede in der Ferrichrom-abhängigen Eisenaufnahme auf, jedoch war die Aufnahme von ^{35}S-Albomycin um 60 Prozent gegenüber dem Wildtyp AB2847 reduziert. Diese Eigenschaften weisen den Stamm H1085 nicht als Chelatoraufnahmemutante auf.

Bedingt durch unterschiedliche Transportraten konnte bei den Versuchen mit ganzen Zellen nicht davon ausgegangen werden, daß in den Zellen gleiche Albomycin-Konzentrationen vorliegen. Da ein Vergleich der Enzymaktivität bei gleicher Konzentration an Albomycin erfolgen sollte, wurde der Vergleich in Rohextrakten der verschiedenen Stämme durchgeführt.

Die Reaktionsbedingungen bei dem Vergleich der Rohextrakte von AB2847 und H1085 entsprachen noch nicht denen der später durchgeführten Versuche, so lagen die Werte für die spezifische Aktivität auch wesentlich niedriger als bei den späteren Versuchen, die Relationen zwischen Mutanten und Wildtyp blieben jedoch erhalten.

Tab.4 Vergleich der spezifischen Aktivität von Rohextrakten aus AB2847 und H1085 nach Wachstum in TY- und M9-Medium. Kaliumphosphatpuffer (10 mM) pH 6,7, Albomycin (6 µg/ml), Protein (4,7 mg/ml)

Stamm	Medium	Spez. Akt.[a]
AB2847	TY	0,2
AB2847	M9	0,4
H1085	TY	0
H1085	M9	0,1

a: µg Albomycin umgesetzt/ mg Protein h

Mit einer Erhöhung der Proteinkonzentration auf 12 mg/ml und einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 Stunden konnte auch mit der Präparation von H1085 aus TY-Medium eine spezifische Aktivität von 0,06 erhalten werden.
Bei dem Stamm Zi33 wurde ebenfalls eine Resistenz in TY-Medium beobachtet. Diese Resistenz trat jedoch nur auf, wenn die Kultur bei 27 °C erfolgte, beim Wechsel auf 37 °C war der Stamm sensitiv, beim Wechsel von 37 °C auf 27 °C trat wieder Resistenz auf (54). Dieses Verhalten schien ziemlich unerklärlich, wenn nicht nur die Temperaturabhängigkeit des Albomycin-Transports die Erklärung sein sollte. Bei H1085 wurde ein solches Verhalten nicht beobachtet. Wie aus der Tab.5 ersichtlich ist, konnte mit Rohextrakten von dem Stamm Zi33 unabhängig von der Anzuchttemperatur keine Inaktivierung von Albomycin erhalten werden, wenn der Abbau bei 27 °C durchgeführt wurde.

Tab.5 Vergleich der spez. Akt. bei AB2847 und Zi33. Anzucht in Ty-Medium bei 27 °C und 37 °C. Ansatz: NADH (10 mM), Dipyridyl (1 mM), $MgCl_2$ (10 mM), Albomycin (5µg/ml), Protein (13 000 x g Überstand, 7,2 mg/ml). Der Ansatz wurde geteilt und bei beiden Temperaturen 20 Minuten mit Albomycin inkubiert.

Stamm	Anzuchttemperatur (°C)	Spez. Akt. (µg/mg Prot. h)	
		27 °C	37 °C
AB2847	37	1,1	1,3
AB2847	27	1,5	1,6
Zi33	37	0	0,4
Zi33	27	0	0,5

Die beim Übergang von 37 °C auf 27 °C beobachtete Resistenz könnte durch die starke Temperaturabhängigkeit der Aktivität (en) bedingt sein. Mit aus dem Stamm Zi33 nach Anzucht in M9-Medium gewonnenen Rohextrakten wurde eine spezifische Aktivität von 1 µg/mg Protein h erhalten, bei dem Stamm AB2847 wurde unter den gleichen Bedingungen eine spezifische Aktivität von 2 - 3 µg/mg Protein h erhalten. Mit Rohextrakten aus einem anderen resistenten Stamm, H416 Ar2/2, konnte ebenfalls nur ein minimaler Abbau von Albomycin erhalten werden. Bei den drei untersuchten Stämmen konnte nach Kultur in TY-Medium eine im Vergleich zu dem Stamm AB2847 nur sehr geringe Inaktivierung

von Albomycin festgestellt werden. In allen Fällen war die geringe Aktivität gegen Albomycin mit Resistenz gegen Albomycin gekoppelt, so daß die Spaltung von Albomycin eine Bedingung für dessen biologische Wirksamkeit sein könnte. Mit Rohextrakten aus allen drei Stämmen war jedoch ein Abbau von Albomycin festzustellen, wenn im Versuch eine Albomycin-Konzentration von mehr als 20 µg/ml und höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt wurden. Nach Abschluß der Arbeit wurde festgestellt, daß diese drei resistenten Mutanten einen Defekt in der Aktivität der Peptidase N aufwiesen. Da die Mutanten, soweit untersucht, nach Kultur in M9-Medium Albomycin-sensitiv waren und auch Aktivität gegen Albomycin zeigten, müssen eine oder mehrere andere Aktivitäten in der Lage sein, Albomycin zu spalten und damit zu aktivieren.

3.4. Charakterisierung der Albomycin-spaltenden Aktivität

Ein nicht enzymatischer Abbau von Albomycin konnte ausgeschlossen werden, da die Aktivität durch kurzzeitige Erhitzung auf 95 ^{o}C zerstört wurde. Zudem zeigten die Versuche mit Rohextrakten von resistenten Mutanten, mit denen keine Inaktivierung von Albomycin erhalten werden konnte, daß die biologische Aktivität von Albomycin durch andere, nicht enzymatische Bestandteile des Rohextrakts, nicht verändert wurde. Wie in der Einleitung aufgeführt, wird nur die eisenfreie Form eines Sideromycins gespalten. Da nach verschiedenen Reinigungsschritten die Aktivität

nur noch mit Desferrialbomycin nachzuweisen war, wurden NADH und Ascorbat als Reduktionsmittel eingesetzt. Während mit Ascorbat keine Steigerung des Abbaus erreicht werden konnte, erwies sich ein großer Überschuß von NADH als günstig. Generell wurde zur Konzentrierung von aktiven Fraktionen eine Fällung mit Ammonsulfat (50% Sättigung) durchgeführt. Im Überstand dieser Fällung konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

3.4.1. Einfluß von Kationen

Tab.6 Einfluß von $MgCl_2$ auf die Inaktivierung von Albomycin. Ein Rohextrakt von AB2847 wurde durch Elution von Bio-Gel P4 von niedermolekularem Material getrennt. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden durch eine Fällung mit Ammonsulfat (50% Sättigung) konzentriert. NADH (10 mM), Albomycin (6 µg/ml), Protein (2,7 mg/ml)

$MgCl_2$ (mM)	Spez. Akt. (µg/mg Protein h)
0	0,3
1	0,6
5	0,9
10	1,2

Ein Einfluß der Kationen K^+ und Na^+ konnte auch bei hohen Konzentrationen nicht festgestellt werden. Nach McCaman

und Villarejo (31) wurde die Hydrolyse von Ala-p-Nitroanilid schon bei einer Konzentration an $MgCl_2$ von 1 mM zu 50 - 60 Prozent gehemmt. Die Aktivität gegen Albomycin erfuhr dagegen bei der gleichen Konzentration an $MgCl_2$ eine Steigerung um 100 Prozent. Nach Miller (33) kann die Spezifität einer Peptidase durch ein Kation verändert werden. Da die oben beschriebenen Versuche mit Rohextrakten durchgeführt wurden und nicht mit einem gereinigten Enzym, läßt sich nicht entscheiden, welche der zur Spaltung von Albomycin befähigten Peptidasen durch Mg^{2+} in der Aktivität gesteigert werden.

3.4.2. Einfluß von NADH und Dipyridyl auf die Inaktivierung von Albomycin

Auch mit Zusatz von NADH (10 mM) war nicht immer ein guter Abbau von Albomycin zu erreichen. Aus diesem Grund wurden Dipyridyl, Bathophenanthrolinsulfonat und das beim Eisentransport zur Unterdrückung des niedrigaffinen Systems eingesetzte Nitrilotriacetat auf ihre Eignung als Fänger für das zweiwertige Eisen untersucht, welches bei der Reduktion des im Albomycin enthaltenen dreiwertigen Eisen entsteht. Albomycin sollte im Reaktionsgemisch somit hauptsächlich in der eisenfreien Form vorliegen. Nitrilotriacetat erwies sich für diesen Zweck als ungeeignet, Bathophenanthrolinsulfonat war ebenso geeignet wie Dipyridyl, konnte jedoch von Bio-Gel P2 nicht mehr eluiert werden.

Tab.7 Einfluß von NADH und Dipyridyl auf die Inaktivierung von Albomycin. Albomycin (50 µg/ml), $MgCl_2$ (10 mM), Protein (Rohextrakt von AB2847, Ammonsulfatfällung (50%), 2,7 mg/ml)

NADH (mM)	Dipyridyl (mM)	Spez. Akt. (µg/mg Protein h)
0,1	0	0
0,1	1	22
0,1	10	8
1	0	11
1	1	21
1	10	18
10	0	7
10	1	21
10	10	18

Die Werte für die spez. Akt. sind gerundet

Durch den Zusatz von Dipyridyl konnte ein wesentlich besserer Abbau von Albomycin erhalten werden. Obwohl die NADH-Konzentration um den Faktor 100 variieren konnte, ohne daß ein merklicher Verlust der Aktivität festgestellt werden konnte, wurde für Abbauversuche eine NADH-Konzentration von 10 mM gewählt, damit stets ein großer Überschuß an Reduktionspotential vorhanden war. Die Kombination NADH (10 mM) mit Dipyridyl (1 mM) konnte Albomycin auch ohne Protein in die eisenfreie Form überführen. Die Reduktion verlief mit Protein jedoch wesentlich schneller, so daß im Rohextrakt vermutlich Reduktasen vorhanden sind,

welche das im Albomycin enthaltene Eisen reduzieren können.

3.4.3. pH-Abhängigkeit der Inaktivierung von Albomycin

Die Aminopeptidase I, wahrscheinlich identisch mit der Peptidase A (34), ist in einem pH-Bereich von 6,5 - 10,5 aktiv, das Optimum liegt zwischen pH 8 und pH 10,5 (48). Unter pH 6,5 ist diese Peptidase nicht mehr aktiv. Auch die Peptidase N zeigt bei pH 7 eine um 40 Prozent reduzierte Aktivität gegenüber dem pH-Optimum von pH 8 bis pH 9 (31).
Die Ermittlung des pH-Bereichs in dem Aktivität gegen Albomycin festzustellen ist, wurde in einem Veronalpuffer durchgeführt, der den pH-Bereich von pH 2 - pH 12 überstreicht.

Tab.8 pH-Abhängigkeit der Inaktivierung von Albomycin.
Albomycin (20 µg/ml), Protein wie in Tab.7
Die Aktivität bei pH 7,5 wurde als 100 Proz. gesetzt.

pH	Prozent Aktivität
4	0
5	14
6,1	100
7,5	100
8,4	94
9,5	69

Die Aktivität ließ sich bei pH 4 und pH 5 fällen, wobei nach Aufnahme in Puffer von pH 7,5 wieder 44 bzw. 67 Prozent der ursprünglichen Aktivität gefunden wurde. Die Aktivität war allerdings nach der pH-Fällung instabil.

3.4.4. Hemmstoffe

Mit den üblicherweise zur Hemmung von Serinproteasen eingesetzten Hemmstoffen Nα-p-Tosyl-L-Lysin Chloromethylketon (TLCK), L-1-Tosylamid-2-phenyläthyl Chloromethylketon (TPCK) und Phenylmethylsulfonylfluorid (je 1 mM) konnte keine Hemmung der Aktivität gegen Albomycin festgestellt werden. N-Äthylmaleinimid (NEM), ein irreversibles Sulfhydrylreagenz, hemmte den Abbau von Albomycin in einer Konzentration von 0,4 mM vollständig. Reversible Sulfhydrylreagenzien wie p-Chloromercuriphenylsulfonat (PCMPS) und p-Hydroxymercuribenzoat (PHMB) hemmten den Abbau in einer Endkonzentration von 1 mM ebenfalls vollständig. Die Hemmstoffe PCMPS und PHMB wurden 20 Minuten mit einer über DEAE-Sepharose gereinigten Fraktion (0,12 mg Protein/ml) bei Raumtemperatur vorinkubiert. Wurde nach der Vorinkubation 1,4-Dithioerythrit (DTE) in einer Konzentration von 3 mM zugegeben, so konnte bei der Hemmung mit PCMPS und PHMB 70 bzw. 60 Prozent der ursprünglichen Aktivität erreicht werden. DTE selbst hemmte allerdings bei der eingesetzten Konzentration um 20 Prozent, bei einer Konzentration von 20 mM hemmte DTE vollständig. Es ist erstaunlich, daß DTE, das üblicherweise als SH-Gruppenschutz

eingesetzt wird, die Reaktion hemmte, da für den Abbau von Albomycin offensichtlich Enzyme mit aktiven SH-Gruppen nötig sind. Mit Cystein, einem schwächeren Reduktionsmittel als DTE, konnte der Abbau von Albomycin in vergleichbaren Konzentrationen nicht gehemmt werden. $CuSO_4$ hemmte bei einer Konzentration von 1 mM ebenfalls vollständig, bei 0,1 mM noch zu 60 Prozent. Die Hemmung beruhte nicht auf einer Hemmung von Reduktasen, da für diese Versuche Desferrialbomycin eingesetzt wurde, das auch ohne den Zusatz von NADH und Dipyridyl abgebaut wird.

3.5. Chromatographische Verfahren zur Reinigung der Albomycin-spaltenden Aktivität

3.5.1. Gelfiltration mit Sephacryl S-200 Superfine

Bei Gelfiltration mit Materialien wie Bio-Gel P100, LKB AcA44 und Sephacryl S-200 Superfine (S-200) eluierte Albomycin-spaltende Aktivität über den ganzen Trennbereich der jeweiligen Säule. Die stärkste Aktivität eluierte in einem Elutionsvolumen, welches der Größe von 100 000 Dalton entsprach. Zur Untersuchung, ob mehr als eine Albomycin-spaltende Aktivität vorliegt, wurde ein Rohextrakt von in TY-Medium gewachsenen Zellen von AB2847 auf S-200 getrennt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit Desferrialbomycin, damit die Unabhängigkeit von Reduktasen gewahrt blieb, und Zusatz von NADH (10 mM) und Dipyridyl (1 mM), um eingeschlepptes Eisen abzufangen. Mit der langen

Inkubationszeit von 2,5 Stunden wurden auch Nebenaktivitäten erfaßt.

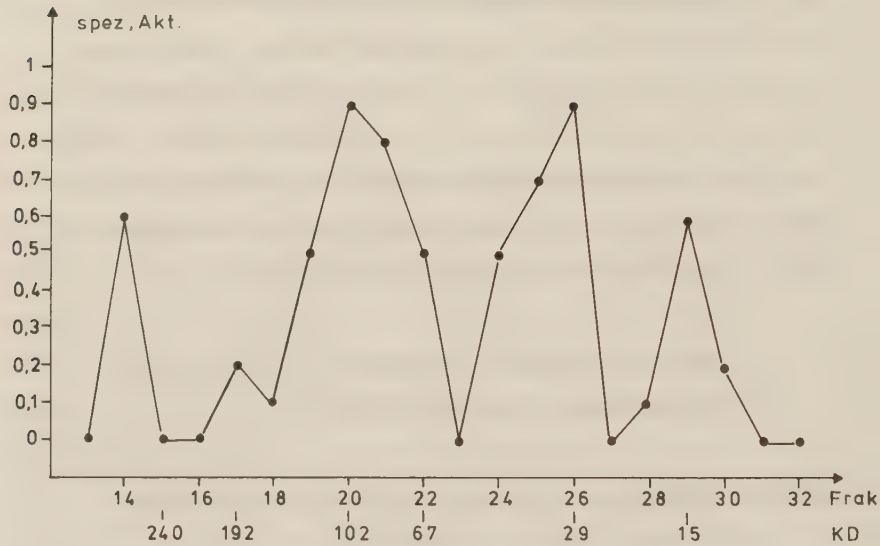


Abb.3 Trennung von Albomycin-spaltenden Aktivitäten auf S-200. 4 ml einer Ammonsulfatfällung (50% Sättigung, 2,7 mg Protein/ml) wurden von einer Säule (Pharmacia K 16/100) mit TRAP + 10 mM $MgCl_2$ bei einem Fluß von 16,5 ml/h eluiert. Es wurden Fraktionen von 5,5 ml aufgefangen.

Die Trennung ergab zwei starke Maxima bei den Fraktionen 21 und 26. Nach den Schultern bei diesen beiden Maxima zu schließen, ist hier mehr als eine Aktivität enthalten. Im Ausschlußvolumen bei Fraktion 14 eluierte eine Aktivi-

tät, welche der Größe nach mit Peptidase A identisch sein könnte.
Die Größenangaben wurden aus den Elutionsvolumina von Dextranblau (Ausschluß), Katalase (240 000), Enolase (82 000) und Rinderserumalbumin (67 000) ermittelt.

3.5.2. Reinigung an DEAE-Sepharose

Da nach der Trennung über Sephacryl S-200 mehrere Aktivitäten auftraten, denen elektrophoretisch im Slab-Gel keine bestimmte Bande zuzuordnen war, wurden stark aktive Fraktionen einer solchen Trennung vereinigt und zur Hemmung eventuell vorhandener Serinproteasen mit 1 mM PMSF versetzt.

Tab.9 Reinigung der Albomycin-spaltenden Aktivität

Schritt	Spez. Akt. (µg/mg Prot. h)	Ausbeute (Prozent)
Rohextrakt	2	100
Ammonsulfatfällung	3	62
S-200	n.b.	36
DEAE	72	1,9

n.b.: nicht bestimmt

Nach dem Auftragen von 50 ml der vereinigten Fraktionen (70 mg Protein) wurde die DEAE-Säule mit 100 ml TRAP gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten

(0 - 0,3 M) von insgesamt 270 ml, wobei der Gradient von 0 - 0,2 M NaCl mit einem Volumen von 50 ml sehr steil gehalten wurde. Da die stärkste Aktivität in früheren Versuchen bei 0,26 M NaCl eluierte, wurde der Gradient von 0,2 - 0,3 M NaCl zur besseren Auflösung mit einem Volumen von 220 ml sehr flach gehalten.

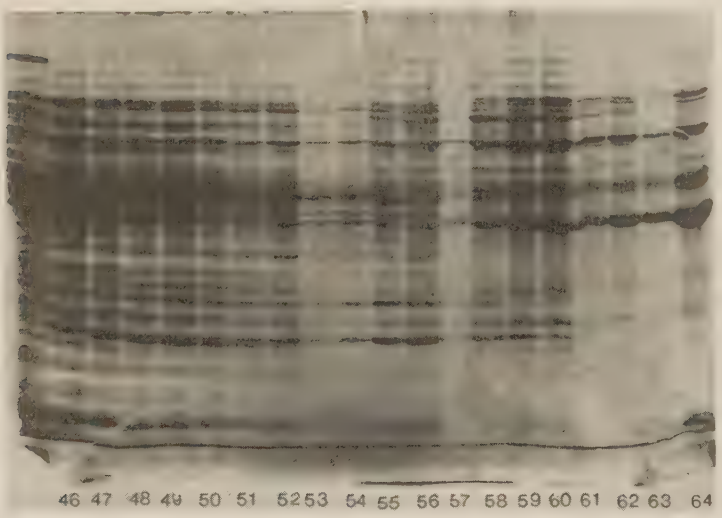


Abb.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese einiger Fraktionen der Trennung auf DEAE-Sepharose

Obwohl die Proteinmuster der Fraktionen 46 - 60 sehr uniform aussehen, wurden beträchtliche Unterschiede in der Aktivität festgestellt. Die Fraktionen 46 - 52 wiesen nur geringe Aktivität auf. Die stärkste Aktivität wurde in den Fraktionen 57 - 60 gefunden, die bei 0,27 M NaCl eluierten.

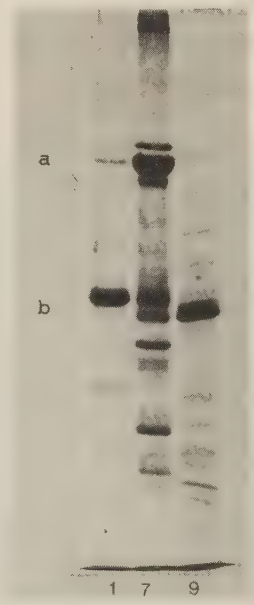
Die Fraktion 61 war genauso aktiv wie die Fraktion 55, obwohl das Proteinmuster dieser beiden Fraktionen Unterschiede vor allem im niedermolekularem Bereich aufweist, so daß hier wohl Aktivitäten in der Größe zwischen 50 000 und 90 000 Dalton aufgetrennt wurden. Eine sichere Identifizierung der Aktivität anhand des Proteinmusters war nicht möglich.

3.5.3. Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose

Da nach Trennung an DEAE-Sepharose die Albomycin-spaltende Aktivität nicht identifiziert werden konnte, wurde ein Versuch unternommen, eine Trennung unter Ausnutzung anderer Kriterien zu erreichen.
Als Ausgangsmaterial wurde ein Rohextrakt von Escherichia coli K-12 W3110 benutzt, da hiervon genügend Zellmaterial zur Verfügung stand.
Der Stamm W3110 wurde in DM-Medium über Nacht im 200l-Fermenter angezogen. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Aufarbeitung, wie sie für den Stamm AB2847 beschrieben wurde. Nach der ersten Reinigung an DEAE-Sepharose wurde eine stark aktive Fraktion, welche bei einer NaCl-Konzentration von 0,27 M eluierte, mit 2 M KCl versetzt und auf eine kleine Säule aufgetragen, die mit 4 ml Phenylsepharose gefüllt war. Nach Waschen mit 2M KCL wurde Aktivität mit 1 M KCl eluiert und weit geringere Aktivität mit Puffer ohne KCl. Die Abb.5 zeigt das Proteinmuster von 3 Fraktionen, wobei die Fraktionen 7 und 9 gleiche

Aktivität aufwiesen, obwohl auf dem Gel verschiedene Muster zu sehen sind. Die erste Fraktion, die bei 2 M KCl eluierte, war nicht aktiv.

Abb.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von über Phenylsepharose gereinigten Fraktionen. 1: Elution mit 2 M KCl 7 und 9: Elution mit 1 M KCl



Anhand von Phagenprotein ergab sich für die mit a bezeichnete Bande eine ungefähre Größe von 73 000 Dalton, für die mit b bezeichnete Bande eine Größe von 37 000 Dalton. Für eine weitere Reinigung wurde ein Rohextrakt von W3110 mit Ammonsulfat (50%) gefällt und in Ammonsulfat (30%) suspendiert. 4 ml des klaren Überstands (18 mg Protein/ml) wurden auf eine mit 2 M KCl äquilibrierte Phenylsepharose-säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit je einem Säulenvolumen TRAP + $MgCl_2$ (10 mM) mit 4 Stufen. Die erste

Stufe enthielt 2 M KCl, die zweite 1 M KCl, die dritte 0,5 M KCl, die vierte Stufe enthielt nur Puffer. Die Aktivitätsbestimmung der einzelnen Fraktionen erfolgte wie zuvor mit Desferrialbomycin + NADH (10 mM) + Dipyridyl (1 mM).

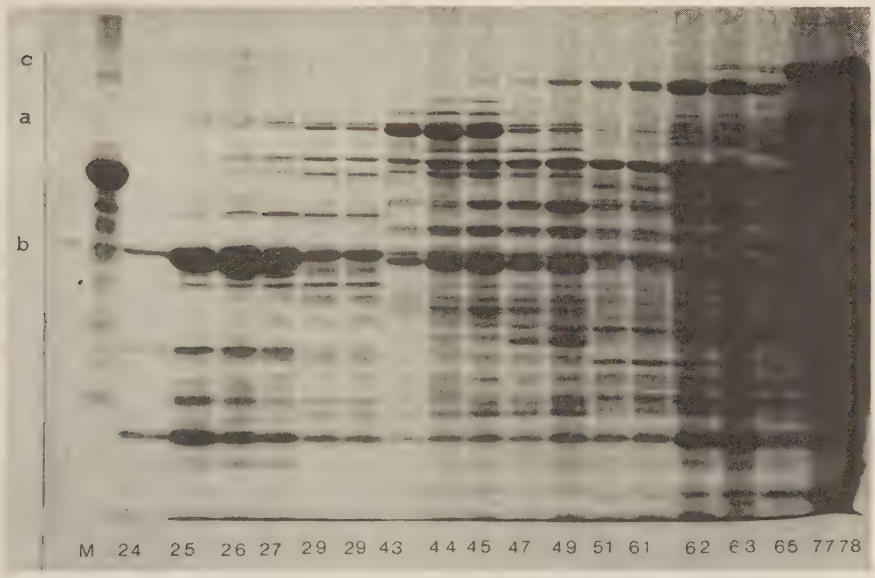


Abb.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese einiger Fraktionen nach der Trennung auf Phenylsepharose
M: Rinderserumalbumin als Marker
Fraktion 24 - 29: Elution mit 1 M KCl
Fraktion 43 - 61: Elution mit 0,5 M KCl
Fraktion 62 - 65: Elution mit TRAP

Bei der Elution mit 2 M KCl wurde keine Aktivität erhalten. Die beiden letzten Spuren zeigen zwei mit reinem

Wasser eluierte Fraktionen, welche noch 63 und 39 Prozent Abbau zeigten. Diese Gelspuren sind stark überladen, jedoch brachten auch nicht überladene Gele dieser Fraktionen keine Aussagen, die zu einer Zuordnung führen konnten.

Tab.9 Aktivität (Prozent Abbau) der Fraktionen von Abb.6

Fraktion	KCl (M)	Abbau
24	1	0
25	1	0
26	1	15
27	1	28
29	1	73
43	1	78
44	0,5	84
45	0,5	73
47	0,5	78
49	0,5	81
51	0,5	39
61	0	48
62	0	63
63	0	63
64	0	28

Auch hier erscheinen die in Abb.5 und Abb.6 mit a und b bezeichneten Banden, denen wahrscheinlich die Aktivität (en)

zuzuordnen ist (sind), und zusätzlich eine mit c bezeichnete Bande bei einem größeren Molekulargewicht, der wahrscheinlich eine dritte Aktivität entspricht. Die Fraktionen 29 und 43 zeigten die gleiche Aktivität, obwohl hier bei der Fraktion 43 die mit a bezeichnete Bande hinzukommt, während die mit b bezeichnete Bande sich unverändert auch in den folgenden Fraktionen hält. Die Abb.7 zeigt eine feinere Abstufung der Fraktionen aus der gleichen Trennung.

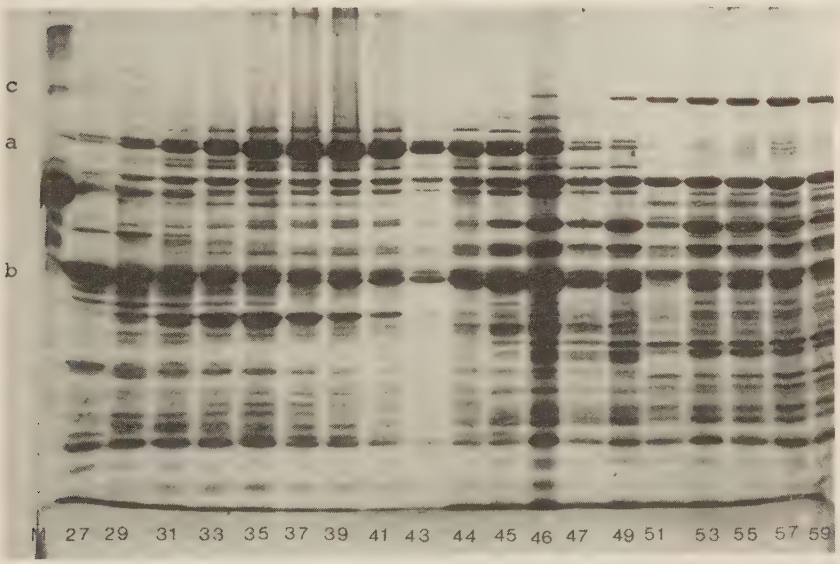


Abb.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese weiterer Fraktionen nach Trennung auf Phenylsepharose
M: Rinderserumalbumin als Marker
Fraktion 27 - 43: Elution mit 1 M KCl
Fraktion 44 - 59: Elution mit 0,5 M KCl

Die Fraktionen 33 - 39 zeigten die stärkste Aktivität, die wahrscheinlich der mit a bezeichneten Bande zuzuordnen ist. Bei der Fraktion 47 schwindet diese Bande jedoch, ohne daß im Vergleich zu der Fraktion 43, wo diese Bande stark ausgeprägt ist, ein Verlust an Aktivität auftrat. Die Fraktionen 53 und 55 zeigten die gleiche Aktivität wie die Fraktion 51, während die beiden Fraktionen 57 und 59 bei gleichem Proteinmuster keine Aktivität zeigten. Die Fraktionen 71 - 76 waren nicht aktiv. Die stark aktiven Fraktionen 31 - 43 wurden vereinigt und nach einer Verdünnung mit TRAP (1:10) auf DEAE-Sepharose weiter gereinigt. Nach diesem Schritt wurde keine Aktivität gegen Desferrialbomycin mehr gefunden.

3.5.4. Affinitätschromatographie an Thiopropylsepharose und Blue Sepharose

Auf der Basis der Versuche mit den Sulfhydrylreagenzien erschien eine Reinigung über covalente Bindung an Thiopropylsepharose möglich, da Proteine mit reaktiven SH-Gruppen an dieses Material binden und mit DTE oder Cystein wieder freigesetzt werden können. Nach einer Reinigung über DEAE-Sephadex A50 wurden aktive Fraktionen vereinigt und auf eine Säule mit diesem Material (1 ml) aufgetragen. Nach Waschen mit 2 ml Puffer wurde mit 2 ml Cystein (20 mM) eluiert, da der Abbau von Albomycin durch das zur Elution besser geeignete DTE bei der gleichen Konzentration gehemmt wurde. Das gleiche Ausgangsmaterial wurde auch einer

Affinitätschromatographie an Blue Sepharose unterzogen. An dieses Material adsorbieren bevorzugt Nucleotid-abhängige Enzyme (45, 51). Die Elution wurde mit 0,5 M NaCl durchgeführt.

Bei allen Ansätzen, auch wenn die Aktivität gegen Desferrialbomycin gemessen wurde, waren NADH (10 mM) und Dipyridyl (1 mM) zugesetzt. Obwohl nach den Hemmversuchen mit Sulfhydrylreagenzien reaktive SH-Gruppen vorliegen sollten, konnte keine Aktivität von der Säule eluiert werden. "Batch"- Versuche hatten das gleiche Ergebnis.

Tab.10 Bindung an Thiopropylsepharose und Blue Sepharose
a: spez. Akt. (µg/ mg Protein h), bestimmt mit Albomycin. b: bestimmt mit Desferrialbomycin
1: an Thiopropylsepharose nicht gebundenes Material
2: an Blue Sepharose nicht gebundenes Material
3: Gemisch (1/1) der Eluate

Fraktion	Spez. Akt.	
	a	b
1	1,5	2,6
2	0	1,6
3	0	0

Der Versuch mit der Blue Sepharose ließ vermuten, daß offensichtlich Reduktasen gebunden werden, da das nicht gebundene Proteingemisch nur noch gegen Desferrialbomycin aktiv war. Die spez. Akt. des Ausgangsmaterials betrug

1,8 µg/mg Protein h, wonach bei der Thiopropylsepharose eine geringe Reinigung zu erwarten wäre. Solche geringen Differenzen können aber auch in der Ungenauigkeit der Bestimmung der Albomycin-Konzentration begründet sein.

3.5.5. Vergleich der Stämme AB2847, H416 und H416 Ar2/2

Bei den Stämmen AB2847 und H416 wurde entsprechend der Sensitivität eine etwa gleich starke Inaktivierung von Albomycin beobachtet, während der resistente Stamm H416 Ar2/2 Albomycin nur wenig abbaute. Die Zellen wurden in TY-Medium angezogen und wie üblich aufgeschlossen.
Die Aktivität (Prozent Abbau) betrug im Rohextrakt 92 Prozent bei den sensitiven Stämmen und 28 Prozent bei dem resistenten Stamm H416 Ar2/2.

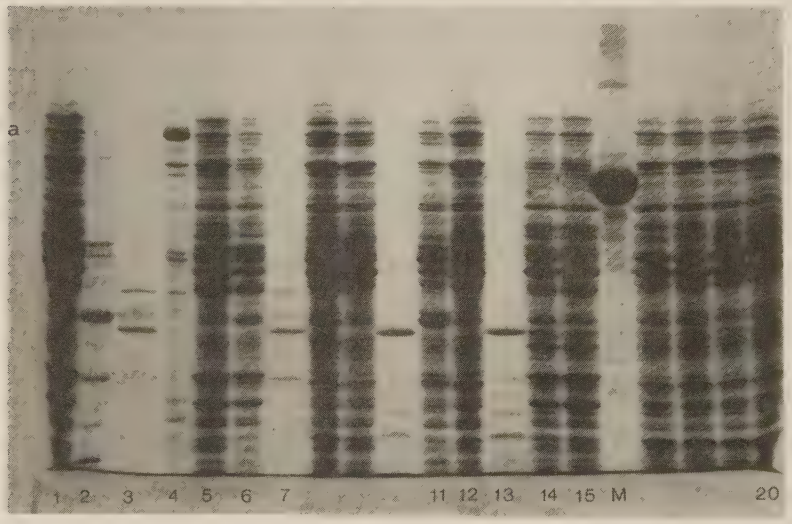


Abb.8

Tab.11 Schlüssel zu Abb.8

Spur	Fraktion	Abbau (Prozent)	Stamm	resistent
1	15-17	28	H416 Ar2/2	ja
2	14	28	H416 Ar2/2	ja
3	8-12	0	H416 Ar2/2	ja
4	43 von Phenyl-sepharose	78	W3110	nein
5	15-17	92	H416	nein
6	14	68	H416	nein
7	9-12	15	H416	nein
11	14	92	AB2847	nein
12	15-17	92	AB2847	nein
13	7- 9	28	AB2847	nein
14	UZ	28	H416 Ar2/2	ja
15	UZ	92	H416	nein
20	UZ	92	AB2847	nein

UZ: Rohextrakt, 100 000 x g Überstand

M: Rinderserumalbumin

Abb.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von löslichen Proteinen der Stämme AB2847, H416 und H416 Ar2/2. Der Rohextrakt wurde auf kleine Säulen (5 ml) mit DEAE-Sepharose aufgetragen und nach Waschen mit 20 ml TRAP + $MgCl_2$ (10 mM) mit 15 ml des gleichen Puffers + 0,3 M KCl eluiert.

Im Proteinmuster sind bei einander entsprechenden Fraktionen der verschiedenen Stämme keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Im Bereich von 90 000 Dalton ist das Muster bei den Spuren 14 und 15 identisch. Die mit a bezeichnete Bande, welche wahrscheinlich der Peptidase N zuzuordnen ist, ist in allen entsprechenden Fraktionen vorhanden, so daß der resistente Stamm H416 Ar2/2 vermutlich ein inaktives Protein bildet.

3.6. Spaltprodukte von Albomycin

Die Hydrolyse von mit ^{3}H- und ^{35}S-markiertem Albomycin ergab *in vivo* und *in vitro* die gleichen Produkte (18). Die Produkte schienen einheitlich zu sein, obwohl durch sukzessive Abspaltung der Aminosäuren vom Aminoende verschiedene Spaltprodukte entstehen könnten. Die verschiedenen Spaltprodukte liegen aber in der Größe so nah beieinander, daß sie wahrscheinlich nicht mittels Gelfiltration getrennt werden können. Zur Spaltung von Albomycin wurden zwei auf verschiedene Weise gereinigte Fraktionen eingesetzt, da keines der gegen Albomycin aktiven Enzyme in reiner Form isoliert werden konnte.

3.6.1. Trennung von Spaltprodukten auf Bio-Gel P2

Ein Rohextrakt aus AB2847, gezogen in TY-Medium, wurde mittels Gelfiltration auf Sephacryl S-200 gereinigt. Die aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch Fällung

mit Ammonsulfat (50% Sättigung) konzentriert. Nach der Aufnahme in TRAP + $MgCl_2$ (10 mM) wurde eine spezifische Aktivität von 2 µg/mg Protein h bei einer Albomycin-Konzentration von 5 µg/ml gemessen. Bei dem Abbau von Albomycin wurde die NADH-Konzentration niedrig gehalten, da NADH in größerer Konzentration bei der folgenden Gelfiltration auf Bio-Gel in einem zu großen Volumen eluierte. Der Ansatz zum Abbau von Albomycin bestand aus: Desferrialbomycin (2 mg), DTE (1 mM), Dipyridyl (1 mM), KCl (50 mM), $MgCl_2$ (10 mM), NADH (0,6 mM), Protein (1,9 mg) in 0,5 ml TRAP. Die Bestimmung der Anfangskonzentration erfolgte mit einer Verdünnung von 10^{-4}, wobei im Gegensatz zur Einwaage nur eine Konzentration von 1,2 mg/ml gefunden wurde. Die Bestimmung der Endkonzentration nach vier Stunden Inkubation bei 37 ^{o}C ergab mit 40 µg/ml einen Abbau von 96 Prozent. Der Verlauf der Trennung (Abb.9) wurde anhand der Extinktion bei 280 nm und 435 nm verfolgt. Obwohl alle benutzten Gefäße zur Entfernung von Eisen mit 10 mM EDTA und reinem Wasser gespült worden waren und keine Extinktion bei 435 nm zu sehen war (Abb.9), waren die vereinigten Fraktionen 29 - 31 und 33 - 35 nach der Lyophilisation schwach rot gefärbt, während die ebenfalls lyophilisierte Fraktion 39 rein weiß blieb. Eine vor dieser Trennung erfolgte Eichung mit Albomycin und Ferrichrom ergab für Albomycin ein Elutionsvolumen von 98 ml, wobei in zwei Läufen bei 72 ml ein schwaches Maximum beobachtet wurde, für Ferrichrom wurde ein Elutionsvolumen von 105 ml erhalten. Von dem Lyophilisat der Fraktionen 33 - 35 (2mg/ml)

mit einem Elutionsvolumen von 122 ml wurden 0,2 ml an XAD-2 adsorbiert und nach Waschen mit Wasser mit Methanol/ H_2O (1/1, v/v) eluiert. Die biologische Aktivität der erhaltenen Produkte wurde auf den üblichen Testplatten für Albomycin (DM-Platten) und auf analog hergestellten Platten mit dem Stamm D22 in NB-Medium untersucht. Der Stamm D22 ist eine envA Mutante mit verstärkter Durchlässigkeit für Substanzen, welche normalerweise die Membran nicht passieren können (36, 37).

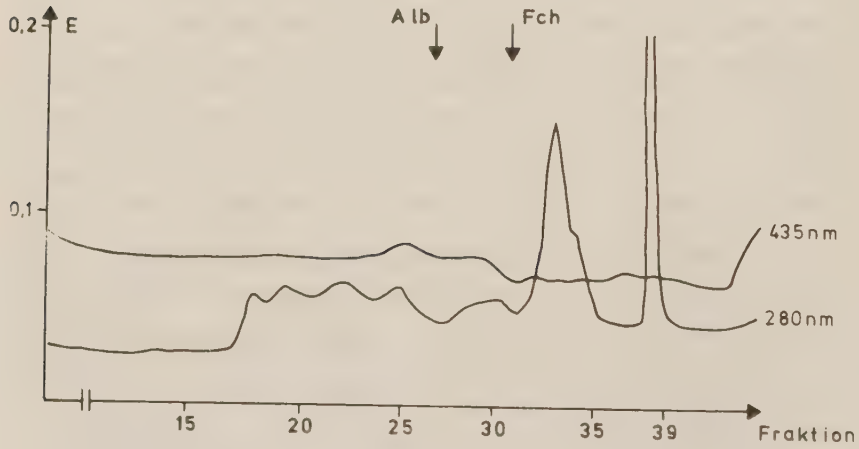


Abb.9 Trennung der Spaltprodukte von Albomycin auf Bio-Gel P2 -400. 0,4 ml des Ansatzes wurden mittels einer Schleife aufgetragen und mit H_2O mit 12 ml/h eluiert. Volumen der Fraktion: 3,6 ml.

Tab.12 Biologische Aktivität der Spaltprodukte von Albomycin

Fraktion	Durchmesser der Hemmzone (mm)	
	W3110	D22
Albomycin (0,6 µg/ml)	26	18
29-31 (2 mg/ml)	/	18
33-35 (2 mg/ml)	/	20
39 (2 mg/ml)	/	/
XAD-Überstand	/	/
XAD-Eluat	/	18
Methanol	/	/
Rifampicin (0,01 mg/ml)	/	17
Actinomycin (0,5 mg/ml)	/	12

/: keine Hemmzone zu erkennen

Die Hemmhöfe der Spaltprodukte auf dem Stamm D22 waren nicht so klar, wie sie mit Albomycin erhalten werden.

Der Einwaage von 2 mg Desferrialbomycin stand nach Lyophilisation eine Gesamteinwaage von 4,9 mg gegenüber, wobei auf die Fraktion (29-31) 1 mg, auf die Fraktion (33-35) 3 mg und 0,9 mg auf die Fraktion 39 entfielen. Der Anteil an Albomycin in der Fraktion (33-35) konnte nicht höher als 0,003 Prozent sein, da einem solchen Anteil eine Hemmzone von 14 mm auf den Testplatten für Albomycin mit dem Stamm W3110 entspräche, so daß die restlichen vier Prozent Albomycin vollständig abgetrennt waren. Im Beladungstest mit ^{14}C-Lys wurde mit der Fraktion (33-35) bei einer

Konzentration von 0,018 mg/ml eine Hemmung von 70 Prozent erhalten, jedoch war eine Verunreinigung durch Lysin nicht auszuschließen, da neben anderen Aminosäuren auch Lysin in dem gleichen Volumen eluierte wie die Fraktion (33-35).

3.6.2. Trennung von Spaltprodukten auf LKB GF05

Nachdem eine reinere Proteinfraktion mit einer spezifischen Aktivität von 72 µg/mg Protein h zur Verfügung stand, wurde ein weiterer Versuch unternommen, Spaltprodukte von Albomycin in reinerer Form zu erhalten. Bei diesem Versuch wurde auf den Zusatz von NADH und Dipyridyl verzichtet, da Dipyridyl bei der Elution mit reinem Wasser nicht vollständig von dem Gel zu eluieren war. Ansatz zum Abbau von Desferrialbomycin: Desferrialbomycin (6 mg), $MgCl_2$ (15 mM), Protein, gereinigt nach 5.3.2. (0,1 mg), in 0,5 ml TRAP, Inkubation: 4 Stunden bei 37 °C.
Der Wert von 12,6 mg/ml, der als Anfangskonzentration im biologischen Test ermittelt wurde, stimmt gut mit der Einwaage überein, die Endkonzentration betrug 4,4 mg/ml, somit wurde mit 65 Prozent Abbau ein schlechterer Abbau als im zuvor beschriebenen Versuch erhalten. Eine Größenbestimmung der Produkte (Abb.10) anhand der Elutionsvolumina ließ sich nicht durchführen, da Substanzen mit einem Pyrimidinring aufgrund von Adsorption offenkundig anomal eluieren. Die Elutionsvolumina einiger Substanzen mit ähnlichen Partialstrukturen wie Albomycin sind in der Tabelle 13 aufgeführt. Die Elutionsvolumina von Ferrichrom (MG 750)

und Uridin (MG 244) zeigen, daß die Trennung niedermolekularer Substanzen nicht auf Größenunterschieden beruhen muß.

Tab.13 Elutionsvolumina einiger Substanzen auf GF05

Substanz	Elutionsvolumen (ml)
Dextranblau (Ausschluß)	54
Albomycin	60
Fraktion 21	93
Uridin	124
Ferrichrom	132
Uracil	148

Elution mit H_2O

Die Fraktionen 21 und 22, die in einem scharfen Maximum eluierten (Abb. 10), erbrachten nach Lyophilisation 3 mg bei der Fraktion 21 und 0,35 mg bei der Fraktion 22. Das Lyophilisat des zweiten Maximums bei Fraktion 25 war nicht wägbar. Bei dem Abbau von Albomycin wurden 65 Prozent umgesetzt, entsprechend 3,9 mg Desferrialbomycin. Die in den Fraktionen 21 und 22 erfaßten Spaltprodukte ergeben zusammen 3,35 mg das entspricht 86 Prozent des umgesetzten Desferrialbomycins, so daß die Produkte nicht wesentlich kleiner als Albomycin sein können.

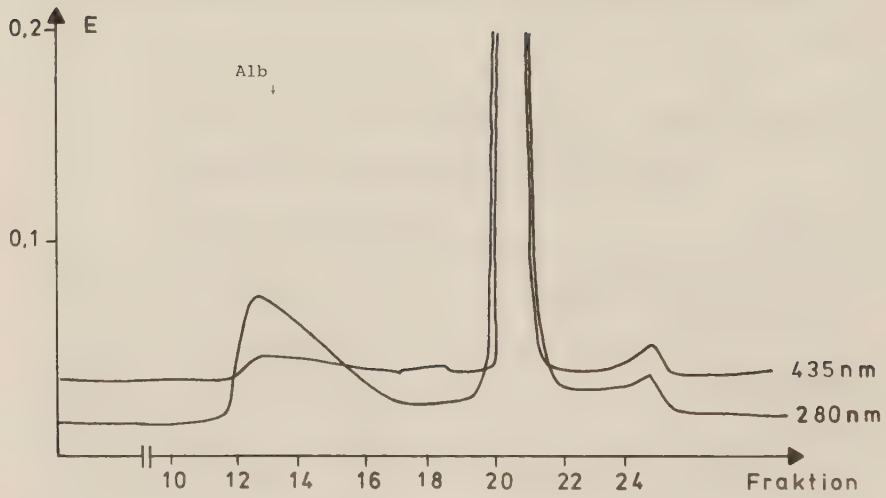


Abb.10 Trennung von Spaltprodukten von Albomycin auf LKB GF05. Säule: K16/100 (Pharmacia). 0,48 ml des Ansatzes wurden mit einer 0,5 ml Schleife aufgetragen und mit H_2O bei einem Fluß von 18 ml/h eluiert. Fraktionsvolumen: 4,5 ml

3.7. Charakterisierung der Spaltprodukte

Die Cochromatographie von Albomycin und Fraktion 21 auf LKB GF05 ergab zwei getrennte Maxima mit unterschiedlicher Extinktion bei 280 nm und vor allem bei 435 nm, wo Albomycin eine schwache Absorption zeigt. Bei der eingesetzten Menge von je 0,1 mg konnte bei Albomycin allerdings keine

Extinktion bei 435 nm beobachtet werden.

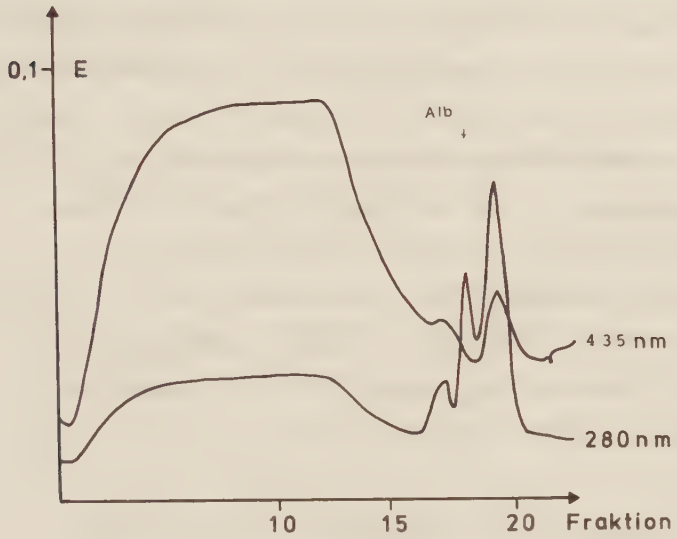


Abb. 11 Cochromatographie von Fraktion 21 und Albomycin auf LKB GF05. Säule: K16/100 (Pharmacia). Jeweils 0,1 mg wurden in insgesamt 0,5 ml H_2O mit einer 0,5 ml Schleife aufgetragen und mit H_2O bei einem Fluß von 12 ml/h eluiert. Fraktionsvolumen: 4 ml

Die Maxima von Albomycin und Fraktion 21 liegen hier näher beieinander als bei der ürsprünglichen Trennung, da bei der Cochromatographie kein Salz zugesetzt wurde, während bei der Trennung 15 mM $MgCl_2$ im Ansatz vorhanden war. Die Trenneigenschaften der Säule hängen stark von der Ionenstärke des Elutionsmittels ab.

3.7.1. Biologische Aktivität der Spaltprodukte

Die Fraktionen 21 (0,7 mg/ml) und 22 (0,07 mg/ml) ergaben vor der Lyophilisation auf dem Stamm W3110 Hemmzonen von 52 mm und 50 mm. Die Fraktion 21 ergab bei dieser Konzentration auf dem Albomycin-resistenten Stamm H416 Ar2/2 eine Hemmzone von 10 mm. Auf einem T5-resistenten Stamm von D22 konnte keine Hemmzone beobachtet werden. Nach Lyophilisation wurden mit den Fraktionen 21 und 22 (je 1 mg/ml) auf dem Stamm H416 Ar2/2/pPF_3/SV_1 trübe Hemmzonen von 25 mm und 30 mm erhalten, während sämtliche Albomycine der gleichen Konzentration keine Hemmzone zeigten.

3.7.2. Dünnschichtchromatographie der Spaltprodukte

Obwohl die Cochromatographie von Albomycin und Fraktion 21 Unterschiede im Laufverhalten zeigte, konnte mit HPLC kein wesentlicher Unterschied im Laufverhalten belegt werden. Die Dünnschichtchromatographie mit zwei verschiedenen Systemen auf Cellulose zeigte jedoch in beiden Systemen Unterschiede im Laufverhalten. Bei allen Proben war mit Ninhydrin keine Reaktion erhalten worden, obwohl die Reaktion mit Vergleichssubstanzen positiv verlief. Alle Flecken, auch die mit Albomycin, waren diffus, so daß ein genaues Ausmessen der Laufstrecken schwierig war, jedoch zeigten die Fraktionen 21 und 22 ein deutlich verändertes Laufverhalten gegenüber den beiden Albomycinen.

Eine Übertragung der Spuren mittels Tesafilm auf entsprechende Testplatten ergab Aktivität über die ganze Spur, auch bei Albomycin, da die Substanzen offensichtlich verschmieren.

Tab.14 Dünnschichtchromatographie auf Cellulose
System I, Ref. (13), je 10 µg

Probe	RF_1	RF_2	RF_3	RF Ref, (13)
δ_1	0,24	0,38	-	0,38
δ_2	0,15	0,23	0,32	0,27
21	0,08	0,21	-	-
22	0,14	0,22	-	-

Tab.15 Dünnschichtchromatographie auf Cellulose
System II, je 10 µg

Probe	RF_1	RF_2	RF_3
$\delta_1 + \delta_2$	0,26	0,35	-
δ_2	0,2	0,33	0,38
21	0,06	0,17	-
22	0,06	0,19	-

3.8. Einfluß der Spaltprodukte auf die Beladung in vitro

Der Wirkort von Albomycin oder dessen Spaltprodukten ist noch unbekannt. Es wurde vermutet, daß durch Albomycin oder dessen Spaltprodukte die Beladung von tRNA analog wie bei dem Sideromycin A 22765 gehemmt wird.
Einen Vergleich der Hemmwirkung von Spaltprodukten und intaktem Albomycin zeigt Abb.12.
Die Fraktion 22 zeigte im Gegensatz zu der Fraktion 21 bei gleicher Konzentration (je 100 µg/ml) keinen Einfluß auf die Beladung bei den drei untersuchten Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Lysin. Diese drei Aminosäuren waren gewählt worden, da in Versuchen von Dengler (8) bei diesen Aminosäuren die stärkste Hemmwirkung von Albomycin auf die Beladung der tRNA festgestellt worden war.
Die Versuche mit Spaltprodukten von Albomycin und mit intaktem Albomycin wurden mehrmals mit gleicher Tendenz durchgeführt. Ein Vergleich mit anderen Präparationen von Spaltstücken wurde jedoch nicht durchgeführt.

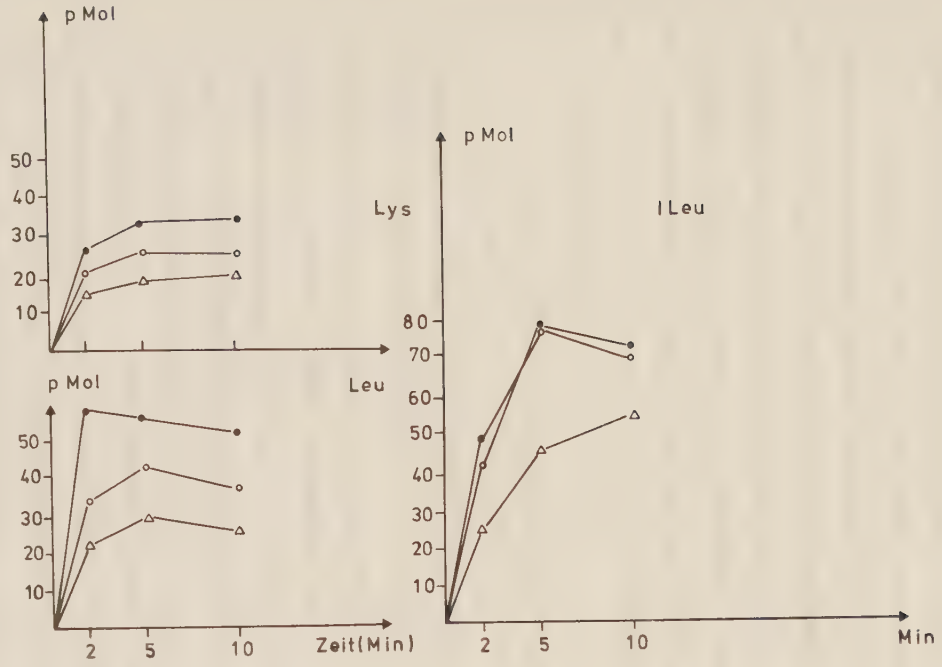


Abb.12 Hemmung der Beladung von tRNA durch Spaltprodukte von Albomycin.
Geschlossenes, rundes Symbol: H_2O, offenes, rundes Symbol: Albomycin (100 µg/ml)
Offenes Dreieck: Fraktion 21 (100 µg/ml)

4. Diskussion

Die meisten Albomycin-resistenten Mutanten von Escherichia coli sind in einem oder mehreren der für die Aufnahme von Albomycin benötigten Transportbestandteile defekt (4) und können Ferrichrom, welches das gleiche Transportsystem benutzt, nicht mehr verwerten. Daneben gibt es eine Gruppe von Mutanten, welche auf Ferrichrom als einziger Eisenquelle wachsen und die normale Empfindlichkeit gegen die Phagen T5 und Ø80 sowie gegen Colicin M zeigen. In dieser Arbeit wurden einige Mutanten von Escherichia coli von diesem Phänotyp untersucht.

4.1. Versuche mit ganzen Zellen

Bei allen Versuchen mit Albomycin waren Bestimmungen der Konzentration mindestens zu Beginn und Ende des Versuchs notwendig, da die Spaltaktivität an der verringerten biologischen Aktivität von Albomycin im Plattendiffusionstest gemessen wurde. Eine Bestimmung der Konzentration mittels HPLC war nicht möglich, da die verwendeten Konzentrationen zu niedrig waren und zudem die Trennleistung der Säule durch den Ansatz verschlechtert wurde. Ein Nachteil der somit notwendigen Konzentrationsbestimmung mittels Plattendiffusiontest ist die auf 20 Prozent beschränkte Genauigkeit der Bestimmung, welche durch die logarithmische Abhängigkeit der Konzentration vom Durchmesser der Hemmzone bedingt ist, eine Differenz von 1 mm entspricht einer Differenz von 20 Prozent in der Konzentration.

Sämtliche Konzentrationsangaben müssen unter diesem Aspekt gesehen werden. Ein optischer Vergleich der Testplatten vermittelte oft einen besseren Eindruck vom Grad der Albomycin-Spaltung als die errechneten Werte.
Bei der Inaktivierung von Albomycin mit ganzen Zellen wurde eine Konzentration von 0,4 ug/ml bis 1 ug/ml gewählt, da höhere Konzentrationen zur Erkennung der Spaltung ungeeignet waren. Es war gleichgültig, zu welchem Zeitpunkt der Wachstumsphase die Zellen geerntet wurden, jedoch sollten mindestens 10^9 Zellen/ml eingesetzt werden.
Generell waren Zellen in Minimalmedium deutlich sensitiver als in Vollmedium. Dies zeigte sich sowohl auf Platten als auch in Flüssigkultur. Die beschriebenen Stämme, welche den oben erwähnten Phänotyp der Albomycin-Resistenz bei gleichzeitiger Erhaltung der Empfindlichkeit gegen die beschriebenen Agenzien zeigten, waren nur in Vollmedium resistent. Die Stämme H1085 und Zi33 waren nur in Minimalmedium, wo sie sensitiv waren, zur Spaltung von Albomycin befähigt. Generell korrelierte eine verringerte Spaltung von Albomycin mit einer Erhöhung der Überlebensrate. Ein meßbarer Abbau von nur 20 Prozent reichte jedoch aus, die Überlebensrate auf 50 Prozent zu drücken. Die resistenten Stämme H1085, H416 Ar2/2 und Zi33 stellten sich nach Abschluß der Arbeit als pepN-Stämme heraus. Offensichtlich ist die Peptidase N, die diesen Stämmen fehlt, ein wichtiges Enzym bei der durch die Spaltung erfolgenden Aktivierung von Albomycin. Die Synthese der Peptidase N wird nicht durch Bestandteile des Mediums reguliert (32), somit müssen in

Minimalmedium, in dem diese Stämme sensitiv sind, andere Peptidasen mit der Fähigkeit zur Aktivierung von Albomycin vorhanden sein. Diese anderen Peptidasen spielen in Vollmedium offenkundig keine Rolle, da Albomycin in diesem Medium von den pepN-Stämmen kaum gespalten wurde.

4.2. In vitro Versuche zur Spaltung von Albomycin

Der Stamm Zi33 zeigte eine Temperaturabhängigkeit der Resistenz. Beim Wechsel von 37 °C auf 27 °C wurden die Zellen resistent, im umgekehrten Fall wurden sie wieder sensitiv (54). Diese Verhalten könnte die Temperaturabhängigkeit des Albomycin-Transports widerspiegeln, so daß in der Zelle die für eine Spaltung notwendige Konzentration nicht erreicht wird. Rohextrakte aus diesem Stamm zeigten jedoch unabhängig von der Anzuchttemperatur, daß die Spaltaktivität bei 27 °C nicht meßbar ist, während die gleiche Probe bei 37 °C Albomycin spaltet. Ein Temperatureffekt in dieser Deutlichkeit war bei dem Stamm AB2847 nicht zu beobachten.

Nach Hartmann (18) war der Albomycin-Transport bei dem partiell resistenten Stamm H1085 um 60 Prozent gegenüber dem Wildtyp AB2847 reduziert, während die Ferrichrom-abhängige Eisenaufnahme unverändert blieb. Wahrscheinlich spielt auch bei den anderen resistenten Stämmen mit, daß sie Albomycin nicht genügend aufnehmen und somit die für eine Spaltung durch restliche Peptidasen notwendige Konzentration nicht erreicht wird. Der resistente Stamm

H416 Ar2/2 zeigte im Plattendiffusionstest in Eisenmangelmedium bei Albomycin-Konzentrationen von 10 µg/ml und 100 µg/ml Wachstumszonen von 18 mm und 23 mm Durchmesser, wenn er das Plasmid pPF_3/SV_1 mit der gesamten fhu-Transportgen-Region trug. Hier wurde gegenüber dem Wildtyp H416 Ar2/2 Albomycin offenbar verstärkt transportiert, so daß die Zelle genügend Eisen erhielt, dennoch wurde Albomycin nicht aktiviert, da auch dieser Stamm nur geringe Spaltaktivität besitzt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde zum Vergleich der verschiedenen Stämme normalerweise bei einer Albomycin-Konzentration von 5 µg/ml bis 10 µg/ml durchgeführt. Diese Konzentration liegt weit unter dem Sättigungsbereich der spaltenden Aktivitäten. Mit einer höheren Konzentration an Albomycin und Protein konnte aber bei allen untersuchten pepN-Stämmen Spaltaktivität nachgewiesen werden, die bis zu 30 Prozent der Aktivität bei dem Stamm AB2847 betrug.

Eine Verbesserung des Abbaus von Albomycin war durch den Zusatz von NADH und Dipyridyl gegeben, welches als Fänger für Fe^{2+} dient, das bei der Reduktion des im Albomycin enthaltenen Fe^{3+} freigesetzt wird. Nach verschiedenen Reinigungsschritten konnte jedoch nur mit Desferrialbomycin ein Abbau erreicht werden. Dieser Befund läßt eine Reduktase vermuten, welche Albomycin vor der Spaltung reduziert, wobei eventuell eine lineare Form von Albomycin entsteht, die von Peptidasen angegriffen werden kann. Unterstützt wurde diese Vermutung dadurch, daß Fraktionen. welche mit Zusatz von NADH und Dipyridyl gegen Albomycin

aktiv waren, nach Passage durch eine Dextranblausäule nur noch gegen Desferrialbomycin aktiv waren. Immobilisiertes Dextranblau wird zur Affinitätschromatographie von Nucleotid-abhängigen Enzymen eingesetzt (45, 51). Bei Versuchen zum Abbau von Albomycin mit Arylsulfatase, Pronase, Proteinase K, Subtilisin und Thermolysin konnte nur mit Proteinase K ein eindeutiger Abbau von Albomycin erreicht werden. Auch hier war der Abbau nur mit Desferrialbomycin möglich. In analogen Versuchen konnte keine Verminderung der biologischen Aktivität von Ferrichrom und Koprogen erhalten werden.

4.3. Albomycin spaltende Aktivitäten

Die Ergebnisse mit der Proteinase K zeigten, daß Albomycin einer Hydrolyse durch Peptidasen zugänglich sein muß. Bei der bisherigen Struktur von Albomycin (Abb.1), von der in dieser Arbeit ausgegangen wurde, ließ sich eine Hydrolyse durch Peptidasen nur schwer verstehen, zumal Ferrichrom nicht in der biologischen Aktivität verändert wurde. Die neueste Struktur von Albomycin (Abb.2) mit dem nicht zu einem Ring geschlossenen Peptidteil zeigt jedoch vier Peptidbindungen, welche durch Peptidasen angreifbar sind. Eine Ninhydrinfärbung, wie bei Benz et al. (3) beschrieben, konnte jedoch im Gegensatz zu Vergleichssubstanzen wie Aminozucker und andere weder mit Albomycin noch mit dessen Spaltprodukten erhalten werden.

Die Bestimmung der Spaltaktivität bei Proteinreinigungen

erfolgte mit Desferrialbomycin und Zusatz von NADH und Dipyridyl, um eingeschlepptes Eisen zu reduzieren und abzufangen. Bedingt durch die notwendigen langen Inkubationszeiten von 2-4 Stunden wurden auch Aktivitäten erfaßt, welche bei der Aktivierung durch ganze Zellen nicht unbedingt eine Rolle spielen müssen. Auf die Benutzung synthetischer Substrate von Peptidasen wurde verzichtet, da nach Aktivität gegen Albomycin gesucht wurde. Payne (40) wies darauf hin, daß auf die Benutzung solcher Substrate verzichtet werden sollte, so sei die von Lazdunski beschriebene Aminoendopeptidase (26) gegen echte Peptide nicht aktiv gewesen.

Die stärkste Aktivität gegen Albomycin hatte nach Gelfiltration auf Bio-Gel P100 eine Größe von etwa 100 000 D. Die nähere Bestimmung der Größe durch Gelfiltration auf Sephacryl S-200 mit einem Trennbereich von 250 000 D bis 10 000 D ergab mehrere unabhängige Aktivitäten. Die erste Aktivität eluierte im Ausschlußvolumen und dürfte demnach ein Molekulargewicht von 300 000 oder mehr besitzen. Die restlichen vier Aktivitäten wurden im Bereich von 200 000 D bis 15 000 D gefunden. Bei Simmonds (43) werden mehrere nicht näher charakterisierte Peptidasen im Größenbereich von 300 000 D bis 10 000 D beschrieben, von denen sich einige auf DEAE nicht trennen ließen. Verschiedene von Miller (33) referierte Peptidasen stimmten hinsichtlich Hemmbarkeit und Ionenbedürfnis nicht mit den Ergebnissen zur Spaltung von Albomycin überein.

Die im Ausschlußvolumen eluierte Aktivität hat in der

Größe und im Elutionsverhalten von DEAE Ähnlichkeit mit der von Vogt (48) beschriebenen Aminopeptidase I, die nach Miller (34) identisch mit der Peptidase A ist. Die stärkste Aktivität hatte ihrem Elutionsverhalten nach eine Größe von etwa 100 000 Dalton. Da das Strukturgen der Peptidase N nahe bei pyrD liegt und die Resistenz bei pyrD kartierte (55), wurde die Peptidase N als die vermutlich wichtigste Aktivität angesehen. Die von Lazdunski beschriebene Peptidase, wahrscheinlich identisch mit Peptidase N, war mit 45 000 Dalton jedoch zu klein(26). Nach Abschluß der Arbeit wurde von McCaman (31) die Peptidase N isoliert und deren Größe in Übereinstimmung mit Lazdunski et al. auf 87 000 Dalton korrigiert. Die Aminopeptidase I und Peptidase N können nicht die einzigen Spaltaktivitäten sein, da die Aminopeptidase I unter pH 6,5 irreversibel geschädigt wird, während die Aktivität gegen Albomycin nach Fällung bei pH 4 und pH 5 zu 45 und 65 Prozent restaurierbar war. Auch die Peptidase N zeigt bei pH 6,5 nur noch geringe Aktivität, zudem wird sie durch Magnesiumionen gehemmt, während die Aktivität gegen Albomycin durch Magnesiumionen verstärkt wurde und auch bei pH 6,1 noch voll aktiv war. Die Aktivität gegen Albomycin besteht offensichtlich aus mehreren Komponenten, wodurch sich Diskrepanzen zu Literaturwerten ergeben. Die Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Aktivität zeigte Übereinstimmung mit den für die Peptidase N angegebenen Daten.

4.4. Spaltung von Desferrialbomycin

Die Spaltung von Albomycin führte zu Produkten, welche bei Gelfiltration nach Albomycin eluierten. Die relative Lage der Produkte zu Albomycin deutet auf eine Übereinstimmung mit den von Hartmann (18, 19) gefundenen Produkten. Eine Auftrennung auf Bio-Gel P2 führte zu zwei getrennten Maxima. Bei hohen Konzentrationen (2 mg/ml) konnte mit den zuerst eluierten Spaltprodukten bei dem "durchlässigen" Stamm D22 eine Hemmwirkung auf ganze Zellen erreicht werden, während auf dem Stamm W3110 keine Hemmwirkung beobachtet wurde. Mit einer besser gereinigten Enzymfraktion wurden nach Gelfiltration auf LKB GF05 ebenfalls zwei Maxima erhalten. Das erste Maximum eluierte in zwei Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von 9 ml. In der Fraktion 21 waren 90 Prozent des Materials enthalten. Das zweite, schwache Maximum eluierte 13 ml später und enthielt kein wägbares Material. Eine Abschätzung der Größe der Spaltprodukte ließ sich nicht durchführen, da bei den zur Gelfiltration verwendeten Materialien Adsorptionseffekte auftreten, welche bei den gegebenen Größenverhältnissen erst eine Trennung ermöglichen. Auf LKB GF05 konnte im Gegensatz zu Bio-Gel P2 eine Abtrennung von Aminosäuren erreicht werden. Durch sukzessive Spaltung vom Aminoende sind mehrere Spaltprodukte denkbar. Die Versuche von Hartmann ergaben jedoch nur ein Produkt mit der ^{35}S-Markierung, wobei nicht auszuschließen ist, daß die in der Größe wenig verschiedenen Produkte auf der

verwendeten Säule nicht trennbar sind. Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit zwei verschiedenen Systemen ergaben in den Fraktionen 21 und 22 insgesamt drei Produkte, wobei ein Produkt in beiden Fraktionen auftrat. Die Fraktionen 21 und 22 zeigten im Gegensatz zu Albomycin gleicher Konzentration Hemmwirkung auf den Albomycin-resistenten Stamm H416 Ar2/2/pPF_3/SV_1. Dieser Stamm zeigte in Eisenmangelmedium im Vergleich zum Wildtyp H416 Ar2/2 verstärktes Wachstum mit Albomycin. Offenkundig kann dieser Stamm dank des Plasmids mit der gesamten fhu-Region Albomycin besser als der Wildtyp aufnehmen. Die Fraktion 21 zeigte bei einer Konzentration von 0,7 mg/ml eine Hemmzone von 10 mm auf dem Albomycin-resistenten Stamm H416 Ar2/2, nach der Lyophilisation wurde mit dieser Fraktion bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine trübe Hemmzone von 25 mm auf dem Stamm H416 Ar2/2/pPF_3/SV_1 erhalten. Der Konzentrationsunterschied von 30 Prozent kann nicht zur Erklärung des großen Unterschieds in dem Durchmesser der Hemmzone dienen, da wegen der logarithmischen Abhängigkeit der Konzentration vom Durchmesser der Hemmzone höchstens 4 mm Differenz zu erwarten wären. Offenkundig wird das Produkt aus Fraktion 21 über das gleiche Transportsystem wie Albomycin aufgenommen, zumal eine T5-resistente Mutante von dem Stamm D22 auch gegen dieses Produkt resistent war. Nach der Dünnschichtchromatographie und der Cochromatographie mit Albomycin sowie nach der Hemmwirkung auf den resistenten Stamm H416 Ar2/2/pPF_3/SV_1 ist zumindest dieses Produkt von Albomycin verschieden.

4.5. Beladung von tRNA

Die Versuche zur Hemmung der Beladung durch gereinigte Spaltprodukte konnten nicht mit einem optimierten Beladungssystem durchgeführt werden. Für jede Aminosäure müßte ein eigenes Beladungssystem optimiert werden, da die Systeme sehr empfindlich sind (44). Zur Beladung wurde eine von DEAE-Sepharose mit 0,3 M KCl eluierte Fraktion benutzt. In dieser Fraktion sind allerdings auch sämtliche gegen Albomycin aktive Peptidasen enthalten, so daß eine Spaltung von Albomycin im Beladungsansatz nicht ausgeschlossen werden konnte. Dennoch konnte mit der Fraktion 21, vorhergehende und nachfolgende Fraktionen waren wirkungslos, eine deutlich stärkere Hemmung der Beladung als mit Albomycin erhalten werden. Dengler (8) konnte mit Albomycin bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-4}$ M eine Hemmung der Beladung mit neun verschiedenen Aminosäuren erreichen. Diese Hemmung war mit fortschreitender Reinigung der Beladungsenzyme jedoch nicht mehr zu erreichen. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration der Spaltprodukte und von Albomycin von 10^{-4} M erbrachte bei den Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Lysin eine deutlich stärkere Hemmung durch die Fraktion 21 im Vergleich zu Albomycin. Der Unterschied in der Konzentration, bei ganzen Zellen hemmt eine Konzentration von 4×10^{-6} M sehr stark, während bei der Beladung eine Konzentration von 10^{-4} M eingesetzt werden mußte, erscheint sehr beachtlich. Betrachtet man jedoch den Anreicherungsfaktor 500 (18), der von ganzen Zellen erreicht wird, so entspricht die *in vitro* eingesetzte Kon-

zentration durchaus den Verhältnissen in vivo. Bei dieser hohen Konzentration ist eine unspezifische Hemmung durch das Spaltprodukt vorstellbar, zumal mindestens bei den drei untersuchten Aminosäuren die Beladung gehemmt wurde. Das Spaltprodukt müßte demnach von verschiedenen Aminoacylsynthetasen erkannt werden können. Bis jetzt wurden noch keine Wirkort-resistenten Mutanten gefunden, mit denen sich die Wirkungsweise von Albomycin und dessen Spaltprodukte untersuchen ließen. Dies ist ein Argument dafür, daß es eventuell nicht nur einen sondern mehrere Wirkorte für das Spaltprodukt von Albomycin in der Zelle gibt.

5. Zusammenfassung

Die bakterizide Wirkung von Albomycin hängt von der Aufnahme in die Zelle und der dort erfolgenden Spaltung ab. Die Stämme H1085, H416 Ar2/2 und Zi 33 sind in Vollmedium resistent gegen Albomycin, während sie in Minimalmedium sensitiv sind. Die Resistenz korreliert mit dem Fehlen von Spaltaktivität gegen Albomycin. Diese drei Stämme sind defekt in der Peptidase N, welche wahrscheinlich die Hauptaktivität in der durch die Spaltung erfolgende Aktivierung von Albomycin zu dem eigentlich toxischen Produkt ist. Auch bei diesen Stämmen ist noch eine geringe Aktivität gegen Albomycin vorhanden. Es gibt in *Escherichia coli* mindestens vier Aktivitäten, die in der Lage sind, Albomycin zu spalten. Albomycin muß vor der Spaltung durch Reduktion in die eisenfreie Form überführt werden, diese Reduktion findet unabhängig von der Spaltung statt. Die Hydrolyse durch eine gereinigte Enzymfraktion ergibt zwei Produkte, von denen eines die Beladung der tRNA mit Isoleucin, Leucin und Lysin hemmt. Aufgrund der hohen Konzentration des Spaltprodukts *in vitro* und *in vivo* wird die Möglichkeit einer unspezifischen Hemmung der Beladung diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

1. Bachmann, E. und H. Zähner. 1961. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 28. Mitteilung. Die "in vitro"-Resistenz gegen Ferrimycin. Arch. Mikrobiol. 38: 326-338.
2. Bickel, H., E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, V. Prelog, E. Vischer, A. Wettstein und H. Zähner. 1960. Über eisenhaltige Wachstumsfaktoren, die Sideramine, und ihre Antagonisten, die eisenhaltigen Antibiotika Sideromycine. Experientia 16: 128-133.
3. Benz, G., T. Schröder, W. Karl, T. Kurz, J. Pfitzner, D. Schmidt, G. Steffens und C. Wünsche. 1982. Konstitution der Desferriform der Albomycine. Angew. Chem. 94: 552-553.
4. Braun, V., R.E.W. Hancock, K. Hantke und A. Hartmann. 1976. Functional organization of the outer membrane of Escherichia coli. Phage and colicin receptors as components of iron uptake systems. Journal of Supramolecular Structure 5: 37-58.
5. Braun, V. und K. Hantke. 1977. Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems. In: Microbial Interactions, ed. J.L. Reissig, London: Chapman and Hall. 101-137.

5a. Braun, V., K. Günthner, K. Hantke und L. Zimmermann. 1983. Intracellular activation of the antibiotic albomycin in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. Im Druck.

6. Bryce, G.F. und N. Brot. 1972. Studies of the enzymatic synthetis of the cyclic trimer of 2,3-dihydroxy-N-benzoyl-L-serine in Escherichia coli. Biochemistry 11: 1708-1715.

7. Burnham, B.F. 1963. Investigations on the action of the iron containing growth factors, sideramines, and the iron containing antibiotics, sideromycins. J. gen. Microbiol. 32: 117-121.

8. Dengler, D. 1975. Untersuchungen zur Wirkungsweise des Sideromycins A 22765. Diplomarbeit, Universität Tübingen.

9. Dengler, D. 1979. Untersuchungen zur Wirkungsweise des Sideromycins A 22765. Dissertation, Universität Tübingen.

10. Di Masi, D.R., J.C. White, C.A. Schnaitman und C. Bradbeer. 1973. Transport of vitamin B_{12} in Escherichia coli: Common receptor sites for vitamin B_{12} and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. J. Bacteriol. 115: 506-513.

11. Emery, T. 1976. A convenient assay for siderochrome hydrolytic enzymes. Anal. Biochem. 71: 294-299.

12. Emery, T. 1976. Fungal ornithine esterases: Relationship to iron transport. Biochem. 15: 2723-2728.

12a. Fecker, L.F. 1983. Klonierung der fhu Genregion zur Eisenversorgung von Escherichia coli K 12. Dissertation, Universität Tübingen.

13. Fiedler, H.-P. und J. Sauerbier. 1978. Metabolic products of microorganisms, 165th communication: Isolation and quantitative determination of siderochromes. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5: 51-57.

14. Hantke, K. und V. Braun. 1975. Membrane receptor dependent iron transport in Escherichia coli. FEBS Lett. 49: 301-305.

15. Hantke, K. und V. Braun. 1975. A function common to iron-enterochelin transport and action of colicins B, I, V, in Escherichia coli. FEBS Lett. 59: 277-281.

16. Hantke, K. und V. Braun. 1978. Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in Escherichia coli. J. Bacteriol. 135: 190-197.

17. Hantke, K. und L. Zimmermann. 1981. The importance of the exbB gene for vitamin B_{12} and ferric iron transport. FEMS Microbiol. Lett. 12: 31-35.

18. Hartmann, A. 1980. Mechanismus der Ferrichrom- und Albomycinaufnahme in Escherichia coli K-12. Dissertation, Universität Tübingen.

19. Hartmann, A. und V. Braun. 1979. Uptake and conversion of the antibiotic albomycin by Escherichia coli K-12 Eur. J. Biochem. 99: 517-524.

20. Hartmann, A. und V. Braun. 1980. Iron transport in Escherichia coli: Uptake and modification of ferrichrome. J. Bacteriol. 143: 246-255.

21. Kadner, R.J. und G. McElhaney. 1978. Outer membrane dependent transport systems in Escherichia coli: Turnover of tonB function. J. Bacteriol. 134: 1020-1029.

22. Kadner, R.J., K. Heller, J.W. Coulton und V. Braun. 1980. Genetic control of hydroxamate-mediated iron uptake in Escherichia coli. J. Bacteriol. 143: 256-264.

23. Kenig, M., E. Vandamme und E.P. Abraham. 1976. The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. J. Gen. Microbiol. 94: 46-54.

24. Knüsel, F. und W. Zimmermann. 1975. Sideromycins. In: Antibiotics, Vol. III, Corcoran, J.W. und F.E. Hahn, eds. Springer: Berlin-Heidelberg-New York.

25. Latil, M., M. Murgier, A. Lazdunski und C. Lazdunski. 1976. Isolation and genetic mapping of Escherichia coli aminopeptidase mutants. Molec. gen. Genet. 148: 43-47.

26. Lazdunski, C., J. Busutill und A. Lazdunski. 1975. Purification and properties of a periplasmic aminopeptidase from Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 60: 363-369.

27. Leong, J. und J. Neilands. 1976. Mechanisms of siderophore iron transport in enteric bacteria. J. Bacteriol. 126: 823-830.

28. Luckey, M., J.R. Pollack, R. Wayne, B.N. Ames und J.B. Neilands. 1972. Iron uptake in Salmonella typhimurium: Utilization of exogenous siderophores as iron carriers. J. Bacteriol. 111: 731-738.

29. Maehr, H. und J. Berger. 1969. The production, isolation, and characterisation of a grisein-like sideromycin complex. Biotechnol. Bioeng. 11: 1111-1123.

30. Maehr, H. und R.G. Pitcher. 1971. Identity of albomycin and antibiotic Ro 5-2667. J. Antibiot. 24: 830-834.

31. McCaman, M.T. und M.R. Villarejo. 1982. Sructural and catalytic properties of peptidase N from Escherichia coli K-12. Arch. Biochem. Biophys. 213: 384-394.

32. McCaman, M.T., A. McPortland und M.R. Villarejo. 1982. Genetics and regulation of peptidase N in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 152: 848-854.

33. Miller, C.G. 1975. Peptidases and proteases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Ann. Rev. Microbiol. 29: 485-504.

34. Miller, C.G. und K. McKinnon. 1974. Peptidase mutants of Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 120: 355-363.

35. Miller, C.G. und G. Schwartz. 1978. Peptidase deficient mutants of Escherichia coli. J. Bacteriol. 135: 603-611.

36. Normark, S., H.G. Boman und E. Matsson. 1969. Mutant of Escherichia coli with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. J. Bacteriol. 97: 1334-1342.

37. Normark, S. 1970. Genetics of a chain forming mutant of Escherichia coli. Transduction and dominance of the envA gene mediating increased penetration to some antibacterial agents. Genet. Res. Camb. 16: 63-78.

38. Nüesch, J. und F. Knüsel. Sideromycins. In: Antibiotics, Vol. I, Gottlieb, D. und P.D. Shaw, eds. 1967. Springer: Berlin-Heidelberg-New York.

39. O'Brien, G., B. Cox und F. Gibson. 1971. Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 237: 537-549.

40. Payne, J.W. 1977. Peptide transport and hydrolysis. Transport and hydrolysis of peptides by microorganisms. Ciba Foundation Symposium 50, New Series.

41. Poddubnaya, N.A. und E.P. Krysin. 1962. The structure of the amino acid fraction of the antibiotic albomycin. Coll. Czech. Chem. Comm. USSR 32: 990-991.

42. Porra, R.J., L. Langman, I.G. Young und F. Gibson. 1972. The role of ferric enterochelin esterase in enterochelin-mediated iron transport and ferrochelatase activity in Escherichia coli. Arch. Biochem. Biophys. 153: 74-78.

43. Simmonds, S. 1976. Soluble tri- and dipeptidases in Escherichia coli K-12. Biochem. 15: 261-271.

44. Söll, D. und P.R. Schimmel. 1974. Aminoacyl-tRNA-synthetases. In: The Enzymes, Vol. X, ed. P.D. Boyer, New York-London: Academic Press.

45. Thompson, S.T., K.H. Cass und E. Stellwagen. 1975. Blue-Dextran-Sepharose. An affinity column for the dinucleotide fold in proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 669-672.

46. Turkova, J., O. Mikes und F. Sorm. 1963. Determination of the structure of the peptide moiety of the antibiotic albomycin. Experientia 19: 633-634.

47. Turkova, J., O. Mikes und F. Sorm. 1965. Chemical composition of the antibiotic albomycin. VIII. The determination of the sulfur bond in the molecule of the antibiotic albomycin. Coll. Czech. Chem. Comm. 30: 118-127.

48. Vogt, V.B. 1970. Purification and properties of an aminopeptidase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 245: 4760-4769.

49. Wargel, R.J., C.A. Shadur und F.C. Neuhaus. 1971. Mechanism of D-cycloserine action: Transport mutants for D-alanine, D-cycloserine and glycine. J. Bacteriol. 105: 1028-1035.

50. Warren, R.A.J. und J.B. Neilands. 1964. Microbial degradation of the ferrichrome compounds. J. gen. Microbiol. 35: 459-470.

51. Wilson, J.E. 1976. Application of Blue Dextran and Cibacron F_3GA in purification and structural studies of nucleotide-requiring enzymes. Bioch. Biophys. Res. Comm. 72: 816-823.

52. Zähner, H., R. Hütter und E. Bachmann. 1960. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 23. Mitteilung. Zur Kenntnis der Sideromycinwirkung. Arch. Mikrobiol. 36: 325-349.

53. Zähner, H., H. Diddens, W. Keller-Schierlein und H.-U. Nägeli. 1977. Some experiments with semisynthetic sideromycins. Jap. J. Antibiot. 30: (Suppl.) 201-206.

54. Zimmermann, L. (pers. Mitteilung)

55. Zimmermann, L. 1980. Genfusionen zur Analyse Rezeptor-abhängiger Transportprozesse bei Escherichia coli K12. Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Lebenslauf

Klaus-Peter Günthner

5. 12. 1946	geb. in Friedrichshafen-Fischbach a.B.
1953 - 1957	Grundschule in Fischbach
1957 - 1966	Graf-Zeppelin-Gymnasium in Friedrichshafen
1966	Abitur an diesem Gymnasium
WS 1966	Beginn des Studiums der Physiologischen Chemie und Biochemie in Tübungen
1970	Vordiplom
1979	Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie. Thema der Diplomarbeit: Abbau des Antibiotikums Albomycin durch Escherichia coli, angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie II unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun
ab Mai 1979	Anfertigung der Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer, F.-W. Bentrup, W. Bessler, V. Braun, E. Bünning,
H. Diekmann, U. Feine, K. Grell, J. Guglielmi, K. Hantke,
V. Hemleben, E. Kallee, W. Loeffler, H. Mauser, D. Mecke,
H. Metzner, E. Müller, F. Möhres, K. Mörike, H. Probst,
W. Rüdorff, B. Schwemmle, W. Seyffert, W. Voelter, U. Weber,
G. Weitzel, G. Winkelmann, H. Wolf, H. Zähner

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)